

Patrícia Eiko Yamakawa

**Características clínico-laboratoriais, análise
mutacional do gene PIG-A e perfil
metabolômico em pacientes com
hemoglobinúria paroxística noturna.**

Tese apresentada à
Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO
2019**

Patrícia Eiko Yamakawa

**Características clínico-laboratoriais, análise
mutacional do gene PIG-A e perfil
metabolômico em pacientes com
hemoglobinúria paroxística noturna.**

Orientador: Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues

Tese apresentada à Escola
Paulista de Medicina da
Universidade Federal de São
Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO
2019**

Yamakawa, Patrícia Eiko
Características clínico-laboratoriais, análise mutacional do gene PIG-A e perfil metabolômico em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna./Patrícia Eiko Yamakawa. -- São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.. Programa de Pós-graduação da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia.

Título em inglês: Clinical features, mutation analysis of PIG-A gene, and metabolomic profile in patients with paroxystic nocturnal hemoglobinuria.

1. Hemoglobinúria paroxística noturna. 2. PIG-A. 3. Metabolômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL
DISCIPLINA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Coordenador do programa de Pós-graduação:

Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni

Patrícia Eiko Yamakawa

**Características clínico-laboratoriais, análise
mutacional do gene PIG-A e perfil
metabolômico em pacientes com
hemoglobinúria paroxística noturna.**

Banca Examinadora

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues

Membros

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Prof. Dra Perla Vicari

Prof. Dr. Rodolfo Cançado

Prof. Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira

Membros Suplentes:

Profa. Dra. Martha Mariana de Almeida Santos Arruda

Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Dedicatória

*A meu pai, Takahisa, o maior incentivador
dos meus estudos, desde sempre.*

*A minha mãe, Ivone, por todo o amor,
dedicação e paciência.*

*A meu marido, Carlos, por estar presente
em todos os momentos, bons e difíceis, e
me inspirar todos os dias a ser uma
pessoa melhor.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Celso Arrais, orientador, professor e exemplo de excelente profissional e grande pessoa. Tem me ensinado ao longo destes anos muitas lições de hematologia, medicina e de vida, e continua fazendo a diferença na formação de cada hematologista que tem a oportunidade de conviver com ele. Agradeço o incentivo, paciência e apoio por toda esta etapa.

Aos meus avós Paulo (*in memoriam*) e Dena, que sempre batalharam para cuidar da família e são grandes exemplos e inspiração para mim.

Aos meus tios Minoru, Helio, Marly, Herica, Tsutomu, Miti, Yasuhiro, Edson, Adriana, pelo apoio, cuidado e carinho constantes.

Aos meus sogros José Carlos e Lúcia e meus cunhados Jhun, Yuji e Sara, pela força, presença e exemplo de persistência.

Aos meus primos Andre, Taynara, Ricardo, Julia, Rayssa e Rayane, pelos momentos de alegria e descontração necessários.

Ao Dr João Bosco Pesquero, Caio Perez Gomes, Agatha Mendes, Fabiana Bettoni e Florêncio Porto, pela importante participação no projeto, discussão dos resultados e paciência dedicada no ensino das bases da genética.

Ao Dr Ismael Dale e Dr Paulo D'Amora, pela paciência e entusiasmo em me ajudar a entender o universo das metabolômicas.

A Ernande Xavier e Fabio Guirão por toda a ajuda prestada no trabalho de bancada.

A meus professores da Universidade de Brasília, responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos meus colegas e amigos de trabalho passado e presente, pela compreensão e apoio no meu projeto.

A meus amigos de residência de hematologia, muitos com quem tenho o prazer de conviver até hoje, compartilhando dúvidas e aprendizados.

A todos os docentes da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da USP, em especial Dra Elvira Velloso, Dra Gracia Martinez, Dr Guilherme Fonseca, Dra Sandra Guallandro, Dra Liliana Suganuma, Dra Paula Villaça, Dra Valeria Buccheri, Dra Juliana Pereira, Dr Luis Lage, por todos os ensinamentos fundamentais durante o período da residência médica na instituição.

Aos docentes da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP, em especial Dra Melca Maria Oliveira Barros, Dra Mihoko Yamamoto, Profa. Dra Maria Stella Figueiredo e Prof. Dr. José Orlando Bordin, com quem pude ter o convívio no período da pós graduação e discutir assuntos de interesse.

Ao Dr Matheus Vescovi, pelas discussões e incentivos constantes.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação Paulo Alvarenga, Iara Rabelo, Thiago Xavier, Marcelo Lacerda, Nayara Guedes, Ana Paula Vaz, Daniel Nogueira, Erika Hirose e Daniella Marrese, pessoas por quem tenho grande carinho e com quem eu pude conviver semanalmente por um certo período e dividir as doçuras e as agruras do cotidiano.

Aos residentes que passaram no ambulatório de Anemias Adquiridas e Linfoproliferações durante meu período na instituição, pela alegria, curiosidade e por serem meus maiores incentivadores de estudos sobre os assuntos do ambulatório.

Aos funcionários colaboradores do Hemocentro da UNIFESP e às enfermeiras do Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês, pelo importante auxílio na coleta e transporte de amostras.

Aos pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna e anemia aplásica, por terem confiado no projeto, concordado em participar deste estudo, pelo tempo que os acompanhei no ambulatório e por seu ensinamento ao mostrarem uma força surpreendente mesmo diante de patologia tão séria.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“ Na vida não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

Sumário

Agradecimentos.....	7
Lista de tabelas	13
Lista de figuras	14
Lista de abreviaturas.....	16
Resumo	19
Abstract	20
1. Introdução	21
1.1 – História	22
1.2. Patogênese	23
1.3- Manifestações clínicas	25
1.4 - Hemólise extravascular em pacientes com HPN.....	27
1.5. Classificação da HPN.....	29
1.6. Diagnóstico.....	29
1.7. Prognóstico e Tratamento.....	30
1.8. Mutações do Gene PIG-A.....	33
1.9. Metabolômica	39
2. Objetivos.....	52
2.0. Objetivos.....	53
3. Pacientes e métodos	54
3.0. Métodos.....	55
3.1. Casuística	55
3.2. Parâmetros clínicos avaliados.....	55
3.3. Critérios de Inclusão	56
3.4. Critérios de Exclusão	56
3.5. Amostras:	56
3.5.1. Pesquisa clone HPN:	56
3.5.2. Extração do DNA Genômico para o estudo do gene PIG-A	57
3.5.3. Estudo do Gene PIG-A.....	58
3.6. Identificação das mutações	61
3.6.1 - Reação de amplificação dos fragmentos	61
3.6.2 - Eletroforese em gel de agarose	61
3.6.3 Purificação do DNA amplificado	61
3.6.4 Reação de sequenciamento	61

3.6.5 Precipitação do DNA	61
3.6.6 Sequenciamento	62
3.6.7 Análise de dados.....	62
3.7. Predição de patogenicidade da mutação	62
3.8.Espectrometria de massa para análise da metabolômica	64
3.9.Análise dos resultados	65
4. Resultados	67
4.0.Resultados.....	68
4.1. Pacientes estudados.....	68
4.2. HPN hemolítica.....	69
4.3. Pacientes em tratamento com eculizumabe	74
4.4. HPN subclínica	77
4.5. Sequenciamento do gene PIG-A: Mutações encontradas.....	79
4.6 . Análise <i>in silico</i>	80
4.7. Metabolômica	85
5.0. Discussão	93
6.0. Conclusões.....	114
7.0. Referências	117
8.1. Tabelas.....	127
8.2. Figuras.....	135
8.3. Cartas de aprovação dos Comitês de Ética de cada instituição participante.	150
8.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	155
8.5. Ficha de coleta de dados clínicos.....	160

Lista de tabelas

1. Tabela 1. Primers utilizados na amplificação do gene PIG-A	59
2. Tabela 2. Características clínicas dos 109 pacientes incluídos	68
3. Tabela 3. Características clínicas dos 56 pacientes com HPN hemolítica, associada ou não a outra doença hematológica.....	73
4. Tabela 4. Características clínicas dos 41 pacientes com HPN em uso de eculizumabe.....	75
5. Tabela 5. Comparação de valores laboratoriais antes e após o eculizumabe em pacientes tratados com eculizumabe	76
6. Tabela 6. Comparação de valores laboratoriais entre pacientes TAD positivo e negativo nos pacientes tratados com eculizumabe.....	76
7. Tabela 7. Características clínicas dos 53 pacientes com HPN subclínica.....	78
8. Tabela 8. Detalhes dos pacientes cujo o PIG –A foi analisado	82
9. Tabela 9. Detalhes das mutações encontradas.....	83
10. Tabela 10. Os vinte e cinco metabólitos com maior diferença estatística entre o grupo HPN e controle.....	86
11. Tabela 11. Outros metabólitos de interesse com diferença estatística entre o grupo HPN e controle.....	87
12. Tabela 1 a. Detalhes de cada mutação do PIG-A encontrada em cada paciente.....	128
13. Tabela 2 a. Metabólitos encontrados com diferença estatística nos pacientes com HPN hemolítica.....	131

Lista de figuras

Figura 1. Localização do gene PIG-A no cromossomo X.....	35
Figura 2. Abordagem das “ômicas”	40
Figura 3. Metaboloma	40
Figura 4. Sistema mitocondrial da carnitina e beta-oxidação dos lipídeos	43
Figura 5. Glutaminólise	45
Figura 6. Ciclo de Krebs	45
Figura 7. Papel do metabolismo das carnitinas no turnover de membrana.....	48
Figura 8. Metabolismo da arginina e das poliaminas	49
Figura 9. Representação esquemática do gene PIG-A.....	60
Figura 10A. Sobrevida global nos 109 pacientes com HPN separados em HPN clássica, associada a outra doença hematológica e subclínica.....	71
Figura 10B. Sobrevida global nos pacientes com HPN que receberam ou não receberam eculizumabe	72
Figura 11. Análise pelo método Ortho- PLSDA.....	88
Figura 12. Heat map.....	89
Figura 13. Curva ROC.....	90
Figura 14. Análise não supervisionada comparando os resultados com bancos de metabolômica internacionais	91
Figura 15. Concentrações de acilcarnitinas pré e pós eculizumabe	92
Figura 1 a. Paciente 1	135
Figura 2a. Pacientes 2, 6 18, 23, 25, 26, 30 e 31.....	135
Figura 3a. Pacientes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 31.....	136
Figura 4a. Paciente 2.....	136
Figura 5a. Paciente 3.....	137
Figura 6a. Paciente 3	137
Figura 7a. Paciente 4	138
Figura 8a. Paciente 5	138
Figura 9a. Paciente 5	139

Figura 10a. Paciente 5	139
Figura 11a. Paciente 6	140
Figura 12a. Paciente 7	140
Figura 13a. Paciente 8	141
Figura 14a. Paciente 8	141
Figura 15a. Paciente 8	142
Figura 16a. Pacientes 9, 12, 21	142
Figura 17a. Pacientes 9, 12, 21	143
Figura 18a. Paciente 9	143
Figura 19a. Pacientes 10 e 11	144
Figura 20a. Paciente 10	144
Figura 21a. Paciente 11	145
Figura 22a. Paciente 12	145
Figura 23a. Paciente 14	146
Figura 24a. Paciente 15	146
Figura 25a. Paciente 21	147
Figura 26a. Paciente 24	147
Figura 27a. Paciente 25	148
Figura 28a. Paciente 27	148
Figura 29a. Paciente 29	149

Lista de abreviaturas

A: Adenina

ADMA: dimetilarginina assimétrica

AA: Anemia aplásica

ACADL: acil-CoA desidrogenases de cadeia longa

ACADM: acil-CoA desidrogenases de cadeia média

ACADS: acil-CoA desidrogenases de cadeia curta

ACCL: acilcarnitinas de cadeia longa

Acetil- CoA: acetilcoenzima A

Acil- CoA: colesterol aciltransferase

AHAI: anemia hemolítica autoimune

AIT: acidente isquêmico transitório

ATP: adenosina trifosfato

Arg: Arginina

AUC: área sob a curva

AVE: acidente vascular encefálico

C: Citosina

C3-OH: hidroxipropionilcarnitina

C6: hexanoilcarnitina

C6:1: hexenoilcarnitina

C9: nonanoilcarnitina

C10: decanoilcarnitina

C12:1: dodecenoilcarnitina

C14:1- tetradecenoilcarnitina

C14:2: tetradecadienoilcarnitina

C14:2-OH: hidroxitetradecadienoilcarnitina

C16: palmitoilcarnitina

C16:1: palmitoleilcarnitina

C16:2: hexadecadienoilcarnitine

C16:2-OH: hidroxihexadecadienoilcarnitina

C18: esteroilcarnitina

C18:1: oleilcarnitina

C18:2: linoleilcarnitina

CAM: complexo de ataque a membrana

CO₂: dióxido de carbono

CoA: coenzima A

CR1: receptor 1 do complemento

Cys- Cisteína

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FLAER: Fluorescein-labeled proaerolisina

G: Guanina

G: força gravitacional

G6PD: glicose-6-fosfato-desidrogenase

G/dL: gramas por decilitro

GLS: glutaminase

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HPN: Hemoglobinúria paroxística noturna

IL: interleucina

INDELS: inserções e deleções

IS: imunossupressão

LMA: leucemia mielóide aguda

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: mililitro

MID: membro inferior direito

MIE: membro inferior esquerdo

MSD: membro superior direito

MSD: membro superior esquerdo

ng: nanograma

PBS: tampão fosfato salino (phosphate buffered saline)

PCR: reação em cadeia de polimerase

Phe: Fenilalamina

PIG-A: Fosfatidilinositol glicano classe A

RBLB: tampão de lise de hemácias (Red blood cell Lysis buffer)

RFC: força centrífuga relativa

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

ROC: (receiver operator characteristic)

SCD: estearoil-CoA desaturase

Ser: Serina

SMD: síndrome mielodisplásica

SNPs: polimorfismos de nucleotídeo único

T: Timina

TAD: teste de antiglobulina direta

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TCPH: Transplante de células progenitoras hematopoiéticas

TNF: fator de necrose tumoral

Trp: Triptofano

Tyr: Tirosina

U/L: unidades por litro

μL: microlitro

Val: Valina

WHO: World Health organization

Resumo

Introdução: A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença causada por uma anormalidade adquirida no gene da fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A), o que leva à deficiência parcial ou completa das proteínas de ancoragem ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), como as proteínas reguladoras do complemento CD59 e CD55, resultando em um aumento na sensibilidade das hemácias à ação lítica do complemento. As manifestações clínicas incluem um espectro variável de anemia hemolítica, estado pró-trombótico, e hematopoese reduzida. **Objetivo:** 1) Analisar as características clínico-laboratoriais de 109 pacientes com HPN clássica, HPN associada a outra doença hematológica ou HPN subclínica; 2) Avaliar as mutações do gene PIG-A e possíveis correlações com as manifestações clínicas; 3) Comparar o perfil metabólico dos pacientes com HPN hemolítica a controles saudáveis; e 4) Comparar o perfil metabólico antes e após a aplicação de eculizumabe. **Pacientes e métodos:** Foram estudados 109 pacientes com clone HPN, sendo 56 portadores de HPN hemolítica (44 HPN clássica e 12 HPN associada a outra doença hematológica), e 53 HPN subclínica, definido como pelo menos 0,01% de células com clone HPN associado a outra doença hematológica (anemia aplásica em 95% dos casos). O sequenciamento do gene PIG-A pela técnica de Sanger foi realizado em 31 pacientes. Para avaliação do perfil metabólico, foi realizado espectrometria de massa (Kit AbsoluteIDQ p180, Biocrates, Áustria) em 23 pacientes com HPN com hemólise significativa, comparados a 166 controles saudáveis. Foi ainda realizada avaliação antes e 24 horas após a dose de eculizumabe em 12 pacientes. A análise estatística foi feita através do software MetaboAnalyst 4.0. **Resultados:** Dos 109 pacientes incluídos, 51% eram do sexo masculino. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 41 anos, variando de 18 a 81 anos. Dentre os pacientes com HPN hemolítica, 86% apresentavam fadiga, 66% hemoglobinúria, 45% dor abdominal e 16% disfagia. Tromboembolismo venoso foi observado em 14 casos (25%), sendo trombose abdominal em 7 casos (50%). Sete pacientes (13%) apresentaram trombose arterial (acidente vascular cerebral e acidente isquêmico transitório). Nos 31 pacientes analisados quanto a mutações do PIG-A, foram detectadas 29 variantes diferentes em 27 pacientes. Entre elas, 23 eram novas mutações, sem descrição prévia na literatura, 3 eram mutações já publicadas e 3 eram polimorfismos de nucleotídeo único. As mutações foram predominantemente de pequenas deleções e simples troca de bases. Não houve qualquer correlação entre as mutações encontradas e as manifestações clínicas dos pacientes. Os principais metabólitos aumentados nos pacientes com HPN foram acilcarnitinas de cadeia longa, enquanto os principais metabólitos reduzidos nos pacientes com HPN foram fosfatidilcolinas, histidina, glutamato, taurina e aspartato. A razão de C14:1/C16:1 mostrou-se um marcador confiável de HPN, sugerindo que há alongação dos lipídeos nesses pacientes, o que não acontece nos controles. Quando avaliamos pacientes imediatamente antes de receber eculizumabe e 24 horas após a administração do medicamento, notamos uma tendência a normalização na dosagem de C6:1 e nas razões C14:1/C6 e C4/C6, correspondentes a atividade de desidrogenases de acil-CoA de cadeia média e curta, respectivamente.

Conclusão: Observamos que as características clínicas e a distribuição entre os três subtipos de HPN nesse grupo de portadores de HPN foram semelhantes às de outras séries da literatura, exceto por menores taxas de trombose, doença renal crônica e mortalidade. Foram detectadas mutações no PIG-A na maioria dos pacientes com HPN, sendo quase todas (exceto três) ainda não previamente descritas, não sendo observada correlação entre os tipos de mutação e a manifestação clínica. Encontramos diferenças nos metabólitos dos pacientes com HPN quando comparados aos controles saudáveis, sugerindo um perfil metabólico próprio destes pacientes, além da tendência a normalização desses metabólitos após o uso de eculizumabe.

Palavras chave: hemoglobinúria paroxística noturna, metabólica, PIG-A, mutação

Abstract

Introduction: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a disorder due to an acquired abnormality in the phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A) gene. This leads to partial or complete absence of all GPI-linked proteins, like the complement regulatory proteins CD59 and CD55, resulting in an increased sensitivity of the red blood cells to the action of complement. The clinical manifestations of PNH include hemolytic anemia, a hypercoagulable state, and reduced hematopoiesis. **Aims:** 1) To study the clinical characteristics of a group of patients with classical PNH, PNH associated with another bone marrow disorder or subclinical PNH (PNH clone associated with another bone marrow disease); 2) To identify and to correlate PIG-A gene mutations with clinical manifestations in these groups of patients; 3) To compare a metabolomic profile in the hemolytic group with healthy controls, and 4) To compare a metabolomic profile before and after the use of eculizumab. **Patients and methods:** We studied 109 patients with PNH clone: 56 had hemolytic PNH (44 classical PNH and 12 associated with other bone marrow disorder), and 53 patients had subclinical PNH - PNH clone (defined as at least 0.01% of cells with PNH clone) associated with another bone marrow disease (aplastic anemia in 95% of the cases). The sequencing of the PIG-A gene was performed in 31 patients using the Sanger technique. To perform metabolomic profile, we used mass spectrometry (Kit AbsoluteIDQ p180, Biocrates, Austria) in 23 patients with hemolytic PNH. Besides, in twelve patients samples were also collected before and 24 hours after receiving eculizumab. The statistical analysis was performed by the software MetaboAnalyst 4.0. **Results:** Among the 109 patients included, 51% were male, the median age at diagnosis was 41 years, ranging from 18 to 81. Among the patients with hemolytic PNH, 86% had fatigue, 66% had hemoglobinuria, 45% abdominal pain and 16% had dysphagia. Venous thromboembolism was observed in 14 cases (25%), with abdominal thrombosis in 7 cases (50%). Seven patients (13%) had arterial thrombosis (stroke or transient ischemic attack). Among the 31 patients analyzed for PIG-A mutations, 29 different variations were detected in 27 patients: 23 were new mutations, with no previous description in the literature, 3 were previously described mutations and 3 were single nucleotide polymorphism. Mutations were predominantly small deletions and simple base changes. There was no correlation between the PIG-A mutations and the clinical manifestations. The major metabolites increased in the PNH group were long- chain acylcarnitines, while the major metabolites reduced in the PNH group were phosphatidylcholines, histidine, glutamate, taurine and aspartate. The C14:1/C16:1 ratio was shown to be a reliable marker in these patients with PNH, suggesting a disorder in lipid elongation. When we evaluated patients immediately before and 24 hours after receiving eculizumab, we noticed a trend toward normalization at C6:1 dosage and C14:1/C6 and C4/C6 ratios. **Conclusions:** We observed that the clinical characteristics and the distribution of the three subtypes of PNH in this study were similar to other published series, except for relatively lower rates of thrombosis, chronic kidney disease and mortality. PIG-A mutations were detected in the majority of patients with PNH, and almost all (except three) were novel. No correlation was observed between mutation types and clinical manifestation. We found differences in the metabolites of PNH patients when compared to healthy controls, suggesting a different metabolic profile of these patients, returning to normal levels with the use of eculizumab.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, metabolomic, PIG-A, mutation

1.Introdução

1. Introdução

1.1 – História

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal não maligna das células hematopoiéticas com espectro clínico variável, caracterizado por sinais e sintomas relacionados a hemólise intravascular, estado de hipercoagulabilidade e graus variáveis de insuficiência medular. Trata-se de uma patologia fascinante devido suas peculiaridades: é uma doença rara, com manifestações clínicas graves, cujo diagnóstico ainda é um desafio para clínicos gerais; além disso possui uma fisiopatologia complexa e que ainda guarda muitas questões a serem elucidadas.

Uma das primeiras descrições da HPN foi realizada na Alemanha pelo Dr. Paul Strubing ¹ em 1882, com o relato de um homem de 29 anos apresentando fadiga, dor abdominal e paroxismos noturnos graves de hemoglobinúria. Strubing avaliou que se tratava de hemoglobinúria, e não de hematúria, pois não encontrou eritrócitos na urina, e levantou a hipótese de a hemólise ocorrer no intravascular, e não nos rins, devido a acidose sistêmica decorrente do acúmulo de CO₂ e ácido láctico durante o sono. Relatos posteriores de Marchiafava e Micheli em 1911 levaram ao epônimo, síndrome de Marchiafava-Micheli, termo que caiu em desuso nos dias atuais, devido a pequena contribuição destes autores na doença em si ². Em 1937, Thomas Ham² relatou a rápida hemólise dos eritrócitos da HPN quando colocadas em soro ou plasma acidificado com CO₂ ou adição de ácido láctico; esta hemólise também foi observada caso soro ou plasma normal de voluntários fossem substituídos pelo soro ou plasma dos pacientes; entretanto hemácias do Grupo O de um doador voluntário não sofriam hemólise quando suspensas em soro ou plasma acidificado do paciente. O teste de Ham, que demonstrou que os eritrócitos dos pacientes com HPN eram hemolisados quando incubados com soro acidificado, permaneceu como método diagnóstico padrão por muitos anos até a chegada da citometria de fluxo no final dos anos 1980.

Entre os anos 60 a 90, muitos cientistas demonstraram a ação do complemento na hemólise¹. Sabe-se que a hemólise é subsequente a um defeito na âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), responsável por manter aderidas diversas proteínas à membrana plasmática incluindo duas proteínas regulatórias do

complemento: CD59 e CD55. Alguns anos mais tarde, em 1993, foi descoberta como responsável por este defeito na âncora do GPI uma mutação adquirida no gene da fosfatidilinositolglicana A (PIG-A) do cromossomo X, através dos estudos de um grupo de Osaka. Miyata, Takeda, Kinoshita *et al*³ demonstraram que as mutações eram somáticas e surgiam em uma célula-tronco pluripotente, seguida da expansão clonal dessa célula mutada. Foi observado que a mesma mutação PIG-A encontrada em uma linhagem de linfócitos B avaliada era também encontrada nos neutrófilos do sangue periférico do paciente⁴. Em 1994, Iida *et al* descreveram a estrutura do gene⁵.

1.2. Patogênese

A hemólise intravascular crônica, principal pilar para as manifestações clínicas da HPN, é mediada pela via alternativa do complemento. O sistema complemento é composto por mais de 20 proteínas séricas que interagem entre si a fim de garantir propriedade imunoprotetora, imunorregulatória, pró-inflamatória e citolítica para a célula. A via alternativa do complemento faz parte da imunidade inata. Ao contrário da via clássica do complemento, que faz parte da imunidade adquirida e requer um estímulo de um anticorpo para ser ativada, a via alternativa está em estado contínuo de ativação, podendo ser dividida em dois componentes funcionais; as enzimas C3 e C5 convertase e o complexo de ataque a membrana⁶. As convertases C3 e C5 são complexos enzimáticos que iniciam e amplificam a atividade da via alternativa do complemento e geram o complexo de ataque à membrana (CAM). O CAM é a subunidade citolítica comum das vias clássica e de lectina do complemento, bem como da via alternativa. A proteína CD55 (ou *decay accelerating factor*) inibe a enzima C3 convertase, enquanto CD59 bloqueia a formação do CAM ao inibir a incorporação do C9 a ele. As hemácias normais são protegidas contra a citólise mediada pela via alternativa do complemento principalmente pelo CD55 e pelo CD59. A deficiência de CD55 e CD59 nos eritrócitos de pacientes com HPN é a base fisiopatológica da hemólise intravascular.

O mosaicismismo fenotípico do sangue periférico é uma característica da HPN que foi reconhecida pelo Dr. Wendell Rosse no início da década de 1970². Em seus estudos, as células tipo I foram definidas por terem sensibilidade normal à lise mediada por complemento, as células tipo II eram moderadamente sensíveis ao complemento (2-4 vezes mais sensíveis que o normal), e as células tipo III eram

marcadamente sensíveis ao complemento (15-25 vezes mais sensível que o normal). Análises de proteínas ancoradas GPI na membrana de células hematopoiéticas, principalmente eritrócitos, evidenciaram que, em pacientes com HPN, 40% apresentam uma combinação dos tipos I, II e III. A variabilidade na sensibilidade à lise mediada pelo complemento entre os diferentes fenótipos é explicada por diferenças quantitativas na expressão de CD55 e CD59. A deficiência de GPI nos eritrócitos pode ser completa (células HPN tipo III, ausência completa da proteína) ou parcial (células HPN tipo II, correspondendo a 10% da expressão normal de GPI na célula). Células com níveis normais de proteínas GPI em sua membrana são classificadas como células tipo I. Esta variabilidade na gravidade da deficiência, assim como a proporção de células afetadas, define a extensão das manifestações clínicas da doença⁷.

Por sua vez, o mosaicismo fenotípico da HPN deve-se ao mosaicismo genotípico do PIGA, no qual a mutação somática, seja parcial (PNH II) ou completa (PNH III), inativa a função da enzima. Já que a mutação do PIG-A é uma mutação somática adquirida, nem todas as células hematopoiéticas são afetadas, e é comum um mosaico entre células PIG-A mutadas, com deficiência parcial ou completa do GPI, e células não mutadas, com expressão normal de GPI. Devido a variabilidade de mutações do gene, cada clone mutante do PIG-A pode dar origem a um fenótipo particular. A ocorrência de vários clones em vários pacientes sugere que a taxa de mutação do gene é muito elevada ou que certos indivíduos têm uma tendência acentuada para tais mutações.

Uma alteração no gene PIG-A em células tronco hematopoiéticas parece ser a condição necessária para o desenvolvimento de HPN, no entanto, não está claro se esta mutação somente é suficiente para a manifestação da doença, uma vez que mutações do PIG-A foram encontrados em células progenitoras CD34+ em indivíduos normais, sem qualquer manifestação clínica ou laboratorial de hemólise⁵. Outras alterações na hematopoiese não relacionadas com o defeito no gene da PIG-A podem ser necessárias para permitir que as células acometidas se proliferem na medula óssea.

1.3- Manifestações clínicas

A incidência da HPN não é totalmente conhecida, em parte devido à dificuldade diagnóstica. Nos Estados Unidos, estima-se 1 a 1,5 casos a cada milhão de habitantes^{7,8}. Trata-se de uma doença sem predisposição familiar, que tem incidência semelhante entre homens e mulheres e é predominantemente composta de adultos entre a terceira e a sexta década, embora tenham sido relatados casos em crianças e adolescentes^{9,10}. A HPN tem manifestações clínicas muito variadas e parece se manifestar de modo diferente em americanos e europeus quando comparados com os asiáticos^{11,12,13}. Em uma revisão sistemática da literatura publicada entre 2000 e 2015 que incluiu 509 trabalhos, observou-se mais falência medular em asiáticos: 49% comparado a 39% em caucasianos ($p=0,04$) enquanto que episódios de trombose são mais significativamente frequentes em americanos e europeus: 32,5% comparado a 11,5% em asiáticos ($p=0,0001$)^{14,15}. Hemoglobinúria também foi mais frequente em americanos, estando presente em 50% dos casos, comparado a 41,3% em asiáticos ($p=0,034$)¹⁵.

A história natural da doença é variável desde um curso clínico indolente até manifestações com grande morbidade. Laboratorialmente, a HPN clássica tende a apresentar uma medula óssea hipercelular com hiperplasia da série eritroide, contagem elevada de reticulócitos, haptoglobina consumida, desidrogenase láctica (DHL) 2-10 vezes acima do valor da normalidade e grande população de células HPN (geralmente > 60% em granulócitos)¹⁶.

A anemia hemolítica crônica com teste de antiglobulina direta (TAD) negativo é característica nestes pacientes, podendo haver crises desencadeadas por ativação do complemento durante uma infecção viral ou bacteriana³. Os pacientes costumam queixar-se de fadiga, astenia, mialgia difusa, sendo estes sintomas geralmente desproporcionais ao grau de anemia, com significativo comprometimento da qualidade de vida¹⁷. Outros sintomas são relacionados ao sequestro de óxido nítrico tecidual pela hemoglobina livre liberada durante a hemólise intravascular¹⁸. Sabe-se que o óxido nítrico é relacionado ao relaxamento da musculatura lisa, assim sua depleção pode causar sintomas como dor abdominal, disfagia, espasmo esofágico, disfunção erétil masculina¹⁹. Pode também haver insuficiência renal aguda por hemoglobinúria maciça durante uma crise severa e existe ainda evidência de

redução da função renal pelo depósito de hemossiderina no parênquima renal devido a hemólise crônica²⁰.

Pacientes com HPN apresentam aumento na incidência de eventos tromboembólicos em locais não habituais, como no sistema venoso intra-abdominal, hepático (síndrome de Budd-Chiari) e cerebral²¹. Essa manifestação clínica está relacionada a uma alta morbidade com prejuízo na qualidade de vida, além do impacto na redução de sobrevida, sendo uma das mais importantes causas de mortalidade nestes pacientes. O risco de trombose parece ser relacionado ao tamanho do clone HPN e a presença de hemólise. Em duas séries de casos, quase todos os pacientes que desenvolveram trombose apresentavam mais de 51-60% de clone HPN em granulócitos. Porém, até mesmo pacientes com quantificação de clone tão baixo quanto 10% têm maior incidência de trombose quando comparadas à população geral²². Os mecanismos propostos para o desenvolvimento de trombose em HPN são múltiplos, sendo esta uma área complexa e de grande interesse científico. Fragmentos de membrana derivados da hemólise intravascular, toxicidade da hemoglobina livre, depleção de óxido nítrico, ausência de outras proteínas ligadas a GPI, aumento na atividade e agregação plaquetária, aumento na expressão de fator tecidual e fibrinólise prejudicada são descritos como colaboradores desse processo^{23, 14, 24}.

Muitos dos pacientes com clone HPN têm evidências clínicas de hematopoiese reduzida, sendo bem relatada na literatura a presença de clone HPN em tamanhos variáveis encontradas em pacientes com anemia aplásica (AA). Dacie e Lewis²⁵ relataram pela primeira vez a relação entre HPN e anemia aplásica, bem como a hematopoiese ineficaz na HPN sem AA manifestada. Até 68 % de pacientes com anemia aplásica diagnosticada possuem número aumentado de células com deficiência de proteínas ligadas ao GPI, mas menos de 15% apresentam-se com manifestações clássicas de HPN como anemia hemolítica e manifestações trombóticas¹⁰.

Acredita-se que as células tronco hematopoiéticas com o clone presente são mais resistentes a destruição celular pelos mecanismos autoimunes da anemia aplásica^{3,15,16}. Uma explicação é que as mutações do PIG-A conferem diretamente uma vantagem de sobrevivência, fazendo as células deficientes de GPI relativamente resistentes à morte por apoptose, em comparação com os seus

homólogos não mutados. Em outro estudo, no entanto, a resistência à apoptose não foi relacionado a mutação PIG-A, o que sugere que este não é exatamente o mecanismo para a dominância clonal da HPN nestes casos, sendo este tema ainda objeto de investigação ⁷.

Menos frequente que na anemia aplásica, há relação também entre a presença do clone HPN com síndromes mielodisplásicas (SMD), com detecção de pequena população de células, particularmente em pacientes com diagnóstico de anemia refratária com as seguintes características: medula óssea hipocelular, HLA-DR15 positivo, citogenética normal e maior chance de resposta a terapia imunossupressora²⁶. Há relato de casos de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA), provavelmente relacionada a doença hematológica subjacente a presença de clone HPN²⁷, como no caso de aplasia de medula e mielodisplasia.

1.4 - Hemólise extravascular em pacientes com HPN

A HPN tem como uma das principais marcas a hemólise intravascular crônica devido a falta dos inibidores da ativação da via alternativa do complemento. Sabe-se que essa hemólise intravascular pode ser inibida através do uso do eculizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao complemento C5 e assim previne a formação do complexo de ataque à membrana.

Entretanto, é notado que em muitos dos pacientes tratados com eculizumabe há também persistência de anemia (não relacionada a hipoplasia medular), com manutenção de reticulocitose e evidências bioquímicas de hemólise. Esse fenômeno parece estar relacionado a um mecanismo de hemólise extravascular, ainda não completamente elucidado.

Alguns trabalhos mostram que muitos pacientes apresentam positividade no TAD após o início do tratamento com eculizumabe ²⁸. A partir deste dado, diversos estudos foram realizados para investigar por citometria de fluxo a ligação da fração do complemento 3 (C3) em hemácias de pacientes antes e depois do tratamento com eculizumabe. Não houve evidência de C3 em hemácias de pacientes sem tratamento, entretanto em pacientes após o uso de eculizumabe é constatado que os eritrócitos com o fenótipo HPN (CD 59 negativo) são opsonizados com o complemento C3, em uma significativa proporção de casos, sugerindo um mecanismo de hemólise auto imune²⁹.

Essas observações sugerem que pacientes tratados com eculizumabe apresentam bloqueio da via do complemento a nível de C5, porém as etapas iniciais da cascata, incluindo ativação, deposição e clivagem proteolítica do C3 não são afetadas, levando a um excesso de deposição de fragmentos de C3 nas hemácias, sendo reconhecidas pelos macrófagos presentes no baço e fígado. Assim, essa ligação do C3 às hemácias pode constituir um mecanismo adicional de hemólise em HPN, sendo facilitado pelo tratamento com eculizumabe e produzindo um grau variável de hemólise extravascular^{30, 31}.

Porém, ainda há dúvidas sobre este mecanismo, como a razão de apenas uma pequena fração dos eritrócitos com fenótipo HPN nos pacientes tratados com eculizumabe serem C3 positivo, ou aparentemente não apresentarem benefício evidente com uso de corticoide (tratamento de escolha para anemia hemolítica auto imune) ou alguns pacientes terem uma ótima resposta clínica apesar de apresentarem uma proporção substancial de eritrócitos ligados a C3^{32, 33, 34}. Há estudos com um número pequeno de pacientes japoneses com baixa resposta ao eculizumabe por mutações no gene que codifica a proteína do complemento C5, interferindo na ligação do eculizumabe ao C5³⁵. Outra explicação potencial para a hemólise extravascular crônica em alguns pacientes tratados com eculizumabe é a presença de um polimorfismo do gene do receptor 1 do complemento (CR1). O CR1 tem inúmeras funções no sistema complemento: liga-se a C3b e C4b, acelerando a dissociação das convertases C3 e C5; atua como cofator do fator I na clivagem da C3b e C4b, e tem papel no clareamento de imunocomplexos e no incremento da fagocitose. Assim, em pacientes com esse polimorfismo, quando há uso de eculizumabe e consequente bloqueio do C5, o baixo nível de CR1 nas hemácias leva a lentificação da dissociação da C3 convertase, facilitando o aumento da ligação do C3, opsonização destas hemácias e consequente hemólise extravascular

1.5. Classificação da HPN

O desenvolvimento da citometria de fluxo permitiu a detecção de pequenos clones de HPN que, de outra maneira, não poderiam ser identificados. Assim, o Grupo Internacional de Interesse em HPN sugeriu a classificação da doença em três subtipos³⁷:

1. HPN clássica, caracterizada por episódios de hemólise intravascular, níveis elevados de DHL e reticulocitose, tipicamente com grandes clones HPN. Quando avaliada, a medula óssea mostra hiperplasia de série eritroide, sem evidência morfológica ou citogenética de outra doença hematológica.
2. HPN no contexto de outra doença hematológica, caracterizada por presença clínica/ laboratorial de hemólise em pacientes que também possuem outro diagnóstico concomitante, como anemia aplásica, síndrome mielodisplásica, e menos comumente, doenças mieloproliferativas.
3. HPN subclínica, caracterizada por pacientes que possuem pequenos clones HPN ou predomínio de células Tipo II, sem manifestações clínicas ou laboratoriais de hemólise, sendo encontrado geralmente no contexto de falência medular, como anemia aplásica e síndrome mielodisplásica (anemia refratária).

1.6. Diagnóstico

Como já citado anteriormente, a HPN é uma doença subdiagnosticada devido a raridade e ampla gama de manifestações clínicas. Assim, a realização de investigação é importante e sugerida em todos os pacientes com evidência de hemólise intravascular (hemoglobínúria, hemoglobinemia); pacientes com evento trombótico inexplicado, principalmente quando em locais não usuais (intrabdominal, cerebral); pacientes com anemia hemolítica adquirida e teste de Coombs negativo; pacientes com evidência de hemólise e alguma citopenia; pacientes com anemia aplásica e síndromes mielodisplásicas³⁷. Historicamente, para diagnóstico eram usados o teste da hemolisina ácida (teste de Ham)¹ e o teste de lise por sacarose. Todavia, os dois métodos têm baixa sensibilidade e podem estar falsamente negativos em clones pequenos.

A citometria de fluxo é o exame de escolha na investigação de HPN, avaliando a expressão de proteínas ancoradas pela GPI com alta sensibilidade e

especificidade, sendo capaz de detectar clones tão pequenos como 0,01%⁸. Na prática, a fim de se evitar falsos resultados, utilizam-se pelo menos dois anticorpos monoclonais, como CD59, CD157, CD55, CD16, CD24, CD 66b, direcionados contra duas diferentes proteínas ancoradas pelo GPI, em pelo menos duas linhagens celulares⁸. Pode ocorrer resultado falso negativo no caso de episódio de hemólise recente ou transfusão de hemácias, por isso as hemácias não são o melhor grupo para avaliação, embora sejam importantes pois as células tipo II são mais facilmente detectadas em hemácias. Os granulócitos e monócitos têm um tempo de meia-vida menor e não são afetados pelas transfusões sanguíneas, sendo as melhores linhagens para avaliar o tamanho do clone HPN. A porcentagem de células com deficiência de proteínas GPI-ancoradas é reflexo direto do tamanho do clone HPN, e este dado tem importância clínica e prognóstica. Para aumentar a acurácia do teste pode-se utilizar o método FLAER (*Fluorescein-labeled proaerolisin*), que é um reagente mais sensível por se ligar a uma proteína derivada de toxinas bacterianas chamada aerolisina e que se liga diretamente a âncora da GPI nos monócitos e granulócitos, porém não nas plaquetas e hemácias devido, provavelmente, a maior quantidade de glicoforina que estas apresentam e que interferem com a ligação do FLAER a GPI³⁸. Recomenda-se monitorar a citometria de fluxo a cada seis meses por dois anos até estabilidade, e após anualmente, para pacientes com HPN clássica ou associada a outra doença hematológica. Também é importante monitorar anualmente a citometria de fluxo em pacientes com HPN subclínica, pois pode haver evolução para HPN hemolítica, e esta pode ser precedida por um aumento no tamanho do clone. A imunofenotipagem pode ser repetida em qualquer momento caso houver evidência clínica de hemólise³⁷.

1.7. Prognóstico e Tratamento

A história natural da HPN, por se tratar de uma doença ainda considerada rara, foi definida a partir de várias séries de casos analisadas retrospectivamente em diferentes populações^{27, 39}. Em 2014, foi publicado um estudo do registro internacional da HPN, composto por 1610 pacientes registrados, dentre estes 92,5% eram da América do Norte ou Europa³⁹. Até o momento, não há nenhuma publicação em relação à história natural da HPN em pacientes brasileiros.

O maior grupo de estudo da história natural da HPN vem do Registro de Pacientes da Sociedade Francesa de Hematologia. Em 2008, foi publicado um estudo retrospectivo com 460 pacientes, com mediana do tempo de acompanhamento de 6.8 anos, com sobrevida média de 22 anos²⁷. Por meio de análises multivariadas, foram definidos fatores capazes de influenciar independentemente sobrevida em pacientes com HPN. São eles: transfusões antes de 1985, idade maior que 55 anos, complicações trombóticas independentemente da localização, desenvolvimento de pancitopenia, desenvolvimento de síndrome mielodisplásica ou leucemia aguda²⁷.

A principal causa de morbimortalidade são as manifestações trombóticas, comum em sítios atípicos, como no sistema venoso hepático (Síndrome de Budd-Chiari) e cerebral. Apesar da trombose se manter como a principal causa de óbito, seguida por infecções, outras complicações como falência medular, evolução para doenças neoplásicas como síndrome mielodisplásica e leucemia também podem contribuir para a mortalidade²⁷.

Antes do advento do eculizumabe⁴⁰, o tratamento para pacientes com HPN constituía-se basicamente em medidas de suporte para a hemólise crônica: suporte transfusional, suplementação com ácido fólico e anticoagulação em pacientes com manifestações trombóticas⁷. A hemólise intravascular mediada pelo complemento pode ser inibida pelo bloqueio da formação do complexo de ataque à membrana, composto pelos componentes do complemento C5b, C6, C7, C8 e C9. Em 2006, Hillmen et al publicaram um estudo multicêntrico fase 3, avaliando 87 pacientes com HPN que fizeram uso do eculizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao fator C5 do complemento, impedindo sua ativação em C5b, inibindo a formação do complexo de ataque a membrana e assim reduzindo a hemólise intravascular, mostrando redução na hemólise pela avaliação na queda dos níveis de DHL e redução de necessidade transfusional ($p < 0,001$)⁴¹. Em um estudo que avaliou 79 pacientes com HPN que fizeram uso de eculizumabe, mostrou-se que a sobrevida global foi semelhante ao controle da população geral. Entretanto, quando comparado com pacientes pré uso de eculizumabe, a taxa de sobrevida em 5 anos para esses pacientes foi de 66,8% (IC 95%: 41,4% -85,1%), significativamente pior que a sobrevida em 5 anos nos pacientes tratados com eculizumabe: 95,5% (IC95%: 87,6 % -98,5%)⁴².

O tratamento dos pacientes com HPN com eculizumabe mudou a história natural da doença, mostrando melhora rápida da anemia hemolítica com queda da DHL e redução de necessidade transfusional⁴³, melhora dos sintomas relacionados a depleção de óxido nítrico e consequente ganho na qualidade de vida⁴⁴. O uso de eculizumabe também parece ter papel em evitar tanto a progressão da trombose quanto novos eventos trombóticos, tendo relatos positivos na literatura, incluindo em pacientes com Síndrome de Budd-Chiari que apresentavam piora progressiva em vigência de anticoagulação²⁴, ¹⁴. É uma medicação bem tolerada, possuindo como principal efeito adverso a susceptibilidade a infecções sistêmicas, em especial por bactérias encapsuladas, sendo recomendada vacinação contra meningococo pelo menos duas semanas antes do início do tratamento⁴⁵. A grande desvantagem da droga é seu alto custo e a necessidade de tratamento contínuo, com administração a cada 14 dias, para a manutenção do efeito. Além disso, a droga não tem efeito sobre a alteração mutacional da célula-tronco hematopoética e sobre a insuficiência medular. O uso de eculizumabe está indicado atualmente para pacientes com manifestações clínicas debilitantes decorrentes da hemólise intravascular crônica ou manifestações trombóticas.

O único tratamento curativo disponível ainda é o transplante alogênico de células tronco hematopoéticas, porém esta ainda é associada à morbimortalidade considerável relacionada ao transplante e a complicações decorrentes de doença do enxerto contra hospedeiro. Além disso, nem todos os pacientes tem condições clínicas adequadas para o procedimento ⁴⁶. Entretanto, estudos recentes mostram boas taxas de sobrevida, incluindo esquemas de condicionamento não mieloablativo⁴⁷. O maior estudo retrospectivo, da Sociedade Europeia de Transplante de Medula óssea- EBMT, foi composto por 64 pacientes e mostrou sobrevida global de até 86% em 5 anos. Trinta por cento destes pacientes apresentaram doença do enxerto contra hospedeiro crônico⁴⁸. O transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) alogênico se mantém como o tratamento recomendado para os casos associados a falência medular com citopenias graves, podendo ser considerado em países que não dispõem de acesso ao eculizumabe e cujos pacientes apresentam quadro clínico grave devido a trombose recorrente e hemólise ⁴⁹.

1.8. Mutações do Gene PIG-A

A sequência referência do gene PIG-A contém seis éxons, cinco íntrons e se estende por 16kb, codificando uma proteína que contém 484 aminoácidos^{50, 3}. O éxon 1 (54 bp) não é traduzido, portanto não é codificante; o éxon 2 possui 777bp e contém 66bp não traduzidos; o éxon 3 (133bp), o éxon 4 (133bp), éxon 5 (207bp) e o éxon 6 (2322 bp) contém o restante da sequência codificante (267bp). A região flanqueadora 5' (583bp) tem atividade promotora⁵¹. O gene PIG-A está localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1)⁵, conforme mostrado na figura 1. Uma única mutação pode ser capaz de produzir um fenótipo HPN, porque os homens têm apenas um cromossomo X e apesar das mulheres possuírem dois cromossomos X, um deles é inativado aleatoriamente em suas células somáticas, incluindo células-tronco hematopoiéticas^{51, 52}.

Embora muitas mutações somáticas do gene PIG-A estejam descritas, mutações germinativas são propostas como letais. Há uma descrição⁵³ de uma família com uma doença letal ligada ao X, com manifestações envolvendo fissura palatina, malformações estruturais do sistema nervoso central (SNC), epilepsia e outras anomalias. Foi identificada em uma criança uma única mutação *nonsense*, c.1234C> T no gene PIG-A. Acredita-se que as mutações *PIG-A-null* embrionárias sejam letais, sugerindo esta mutação resulte em biossíntese reduzida, mas não ausente, de âncoras GPI. Mutações em outros genes do PIG, tais como PIG-M, PIG-V, PIG-T e PIG-N, que também codificam proteínas envolvidas na biossíntese da âncora GPI, foram relatados.

Um amplo espectro de mutações adquiridas no PIG-A tem sido descrito¹⁷, com mais de 150 mutações citadas, havendo predomínio de mutações do tipo frameshift^{54, 55}, entretanto sem correlação de um tipo específico de mutação com manifestações clínicas como gravidade da anemia ou presença de trombose. As mutações são geralmente únicas, com poucas mutações repetidas reportadas.

A maior parte das mutações identificadas são mutações pontuais, ou seja, alterações relacionadas a um único nucleotídeo ou um grupo reduzido de nucleotídeos. Entre elas são descritas:

- 1- Mutações silenciosas- mudança de uma das bases do DNA, levando o trio de nucleotídeos a sair de sua sequência normal, porém codificando o mesmo

aminoácido. Assim, apesar da mudança na sequência de DNA, a estrutura da proteína se mantém.

- 2- Polimorfismos: Variabilidade na sequência do DNA em determinadas localizações do cromossomo, denominando-se polimorfismo quando a frequência populacional é superior a 1%. A maioria dos polimorfismos de sequência estão localizadas entre genes ou dentro de íntrons, podendo ser irrelevante para o funcionamento dos genes. Entretanto, podem também estar localizados em sequências codificantes ou regiões reguladoras e levar a repercussão na função da proteína, ter efeitos importantes sobre transcrição ou estabilidade do RNA.
- 3- Mutações *missense*: Alteração de uma das bases de DNA, alterando o trio de nucleotídeos da qual faz parte e levando a codificação de um aminoácido diferente. São chamadas de mutação de sentido trocado por alterar o sentido de codificação do gene ao codificar um aminoácido diferente. Pode alterar a função da proteína em maior ou menor grau, de acordo com a localização e importância deste aminoácido.
- 4- Mutação *nonsense*: Alteração de uma das bases do DNA, de tal forma que o trio de aminoácidos se altera, passando a codificar um códon de término prematuro. Assim, uma mutação que converte um éxon codificante em um códon de término promove a parada de tradução no meio da sequência codificante do RNA mensageiro (RNAm). Tal mutação leva a um produto proteico anormal e pode perturbar as funções reguladoras normalmente exercidas pela região 3' não traduzida.
- 5- Deleções e inserções: Quando ocorrem em uma sequência codificante e o número de bases envolvidas não é múltiplo de três, o quadro de leitura é alterado começando no ponto de inserção ou deleção. O resultado é chamado de mutação *frameshift*: mutações de mudança de matriz da leitura. Assim, a partir do ponto de inserção ou deleção, uma sequência diferente de códons é gerada, codificando aminoácidos incorretos e levando a um produto proteico funcionalmente alterado. Em contrapartida, se o número de pares de base inserido ou deletado for múltiplo de três, não ocorrem mudanças na matriz de leitura e haverá uma simples inserção ou deleção de aminoácidos correspondentes no produto gênico normalmente traduzido.

- 6- Muta  o em *splice site*: inser  o, dele  o, troca de bases ou mudança em um número de nucleotídeos no local de *splicing* (regiões nas quais há a remo  o de   trons e união dos éxons durante a matura  o do RNAm eucariótico) durante o processo de transforma  o do RNA mensageiro precursor para RNA mensageiro maduro. Para genes codificantes de proteínas, as muta  o  es pontuais em regiões 5' e 3' não traduzidas também podem contribuir para a patogenicidade ao alterarem a estabilidade do RNAm ou a eficiência de tradu  o, reduzindo a quantidade de produtos proteicos produzidos.

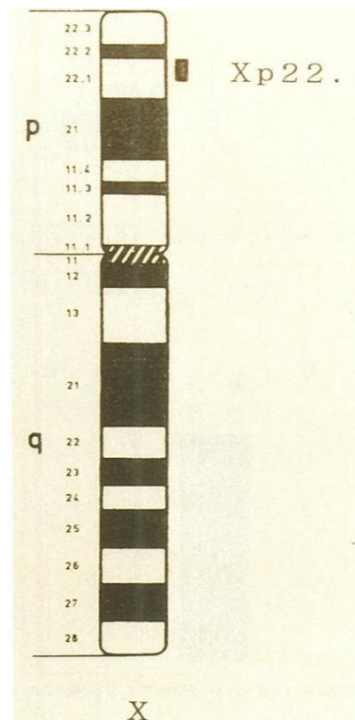


Figura 1. Localiza  o do gene PIG-A no cromossomo X. Retirado de Takeda et al ⁴

Nafa *et al*⁵⁴ relataram quinze mutações diferentes em doze pacientes, encontradas em toda a região do PIG-A. As mutações mais encontradas (67%) foram do tipo *frameshift* (causadas por seis deleções, três inserções e uma in-del). Cinco substituições de pares de base levaram a três mutações *missense*, uma mutação *nonsense* e uma mutação *splice site* no íntron 4. Em três pacientes foi relatada a presença de duas mutações concomitantes. Posteriormente, em outro estudo⁵⁵ Nafa *et al* avaliaram 22 pacientes com HPN clássica e 11 com HPN associada a AA ou SMD. Foram descritas 30 mutações, sendo 28 destas mutações novas, encontradas em toda a região codificadora do PIG-A, observando-se mais mutações do tipo *missense* no éxon 2. As mutações relatadas foram 16 *frameshifts* (10 deleções, 3 inserções, 1 in-del, 2 inserções-duplicações), 6 mutações *nonsense*, 5 *missense*, 2 *splice site*, uma deleção, destacando-se entre as mutações encontradas uma deleção total do gene PIG-A e duas curtas duplicações de nucleotídeos.

Endo *et al*⁵⁶ foram responsáveis por um dos primeiros relatos de que a HPN pode ser uma doença oligoclonal a partir da demonstração de quatro diferentes mutações somáticas em um único paciente, sugerindo que o mosaicismo genotípico da HPN possa ter papel no mosaicismo fenotípico destes pacientes. Bessler, em 1994¹⁷, mostrou que não somente as células tipo 3 como também as células HPN tipo 2 possuíam a mutação no gene, neste caso levando a perda parcial na função do PIGA. Em 1997, Nishimura⁵¹ avaliou duas linhagens celulares B com deficiência total e parcial da âncora de GPI, em células progenitoras hematopoiéticas e granulócitos de sangue periférico, mostrando que as duas linhagens celulares B tinham mutações diferentes: os granulócitos continham duas diferentes mutações; e as células progenitoras, quatro mutações distintas. Esses resultados fortaleceram a origem oligoclonal da HPN e a diferença na expansão de diferentes clones.

Também foram publicados estudos na Ásia, com perfil de mutações semelhantes aos encontrados na América. Yamada *et al*⁵⁷ avaliaram catorze pacientes japoneses com HPN, identificando quinze mutações somáticas do PIG-A- sete mutações *frameshift*, três *missense*, três *splice-site* e dois *nonsense*. Todas as mutações levaram a perda total de função da proteína. Yoon *et al*⁵⁸ estudaram 24 pacientes coreanos, encontrando mutações em 12 pacientes- cinco deleções, seis substituições, e uma inserção, causando seis *frameshifts*, três *splicings* anormais,

uma mutação *missense*, duas mutações *nonsense*. Foi relatado que dois pacientes com manifestação trombótica venosa possuíam somente mutação no éxon 3, porém tal achado não foi relatado em nenhum outro estudo. Em um estudo tailandês, Pramoongjao *et al*⁵⁹ encontraram 37 mutações do PIGA em 33 pacientes, sendo majoritariamente causadas por substituição simples de base e deleções de uma base. Foi encontrado 27 mutações *frameshifts*, o tipo de mutação mais comum, 3 mutações *missense*, duas mutações *nonsense* e quatro *splice site*, sendo semelhante aos achados de pacientes americanos e europeus.

A mutação do PIG-A foi estudada não somente em pacientes com HPN clássica como também em pacientes com clone HPN associada a outra doença hematológica. Mortazavi *et al*⁶⁰ estudaram uma série de 40 pacientes com anemia aplásica e presença de clone HPN confirmada por citometria de fluxo. Foram identificadas 57 mutações em 40 pacientes, sendo a maioria mutações de ponto, como comumente reportado. Entretanto, trata-se um dos poucos estudos que também foi capaz de encontrar inserções maiores, de 30 a 88 pares de bases e deleções maiores que 10 pares de bases em quatro pacientes. Também foi o único estudo que sugeriu *hotspot* (ponto onde as mutações ocorrem com maior frequência no gene) para a doença, pelo achado de uma mesma mutação em doze pacientes-uma deleção de 5 pares de bases (GTACT na posição c.577_c.581 no éxon 2).

Okamoto *et al*⁶¹ avaliaram as mutações do PIG-A de sete pacientes com anemia aplásica, oito pacientes com síndrome mielodisplásica, cinco pacientes com HPN associada a AA e voluntários saudáveis. Foram encontradas 49 mutações somáticas no grupo de pacientes com AA e SMD e 33 mutações nos pacientes com HPN, a maioria encontrada no éxon 2. Não foi encontrada a mutação comum descrita no estudo de Mortazavi. As principais mutações dos pacientes com AA e SMD foram constituídas por substituições de base e mutações *missense*, enquanto deleções e mutações *frameshift* foram mais encontradas em pacientes com HPN, sugerindo que existe diferença na incidência de tipo de mutação entre os dois grupos.

Um dos estudos mais recentes foi publicado por Clemente *et al*⁶², usando o método de *sorting* por citometria de fluxo para separar as células deficientes de GPI e avaliar o gene PIG-A por *next generation sequencing*. Foram avaliados 133 pacientes com HPN, 33 com HPN clássica, 33 AA com clone HPN pequeno e 67

com HPN associada a AA. Foram detectadas 223 mutações no gene PIG-A, 35% mutações *frameshifts*, 34% mutações *missense*, 14% mutações *splice-site*, 13% mutações *nonsense* e in-dels em 3%.

Células com mutação do PIG-A podem ser detectadas no sangue e na medula óssea de indivíduos saudáveis com uma frequência de aproximadamente 2 a 4 a cada 100.000 células (0,002%)⁶³. Hu⁶⁴ demonstrou em 2005 o achado de mutações do PIG-A em pessoas saudáveis isolando células progenitoras CD34 de 27 voluntários saudáveis, encontrando 15 mutações diferentes em nove controles saudáveis. Assim, foi sugerido que a mutação do PIG-A é relativamente comum na hematopoiese, porém nestes casos a mutação parece policlonal, e parece surgir de células formadoras de colônias e não de células-tronco hematopoiéticas multipotentes. Conforme ocorre a diferenciação hematopoiética, ocorre o reparo de DNA e essas mutações não mantêm sua integridade genética, não sendo aptas assim a manter sua propagação. Células com mutação de PIG-A não conseguiram sua expansão em modelos animais, sugerindo que pode haver necessidade de fatores adicionais que permitam a sua evolução clonal.

Há poucos dados em pacientes brasileiros, sendo conhecidos dois estudos; um artigo publicado de Carvalho *et al*⁶⁵, que foi o primeiro a descrever mutações do PIG-A em pacientes brasileiros, e avaliou três indivíduos com HPN. Foram encontradas três mutações de ponto: substituição G → A na extremidade 5' do segundo *ínton*, configurando um 5' *splice site*, resultando na formação de um transcrito anormal e deleção de éxons correspondentes. A segunda mutação constituía-se de substituição T→A na segunda base do códon 430 no éxon 6, levando a um códon de terminação precoce e configurando uma mutação *nonsense*. Por fim a terceira mutação, já descrita por Nafa *et al*⁵⁴ era caracterizada por perda de A na terceira base do códon Arg63, levando a produção de um peptídeo truncado com apenas 67 aminoácidos e configurando assim uma mutação *frameshift*.

O segundo estudo é uma tese de doutorado de Bidoia, BG⁶⁶, desenvolvida no Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP, que avaliou 11 pacientes com HPN e encontrou mutações em dez destes, sendo a maioria delas mutações de ponto, com apenas uma inserção que ocorreu no *ínton* 1 (IVS I inserção CC nt 15). Foram encontradas duas mutações em região promotora: nt-342 G-C em cinco pacientes e nt -44 A-G em 3 pacientes. Havia 4 diferentes

mutações encontradas no éxon 2: códon 19 T-C, códon 171 C-T, códon 185 C-T (encontrada em 4 pacientes) e códon 237 G-T. Havia uma mutação no éxon 5 (códon 342 G-A) e uma no éxon 6 (códon 418 C-T). Foram vistas duas mutações em sítio de *splicing* (IVS II 5'nt 2 G→A e IVS IV 5' nt2 T->C). Duas das mutações encontradas haviam sido descritas anteriormente, uma por Carvalho et al⁶⁵, a troca de G-> A na extremidade 5' do segundo íntron do gene PIG-A, alterando o sítio de *splicing*. A segunda mutação foi um polimorfismo com troca de aminoácido arginina por triptofano no códon 19 sem alterar a função de proteína, descrito previamente por Nafa et al⁵⁴, Endo et al⁵⁶ e Mortazavi et al⁶⁰. Não houve correlação entre os achados e as manifestações clínicas dos pacientes.

Ao nosso conhecimento, não existem muitos estudos com as técnicas atuais de sequenciamento do gene PIG-A em portadores de HPN, assim como não existem muitos estudos que avaliaram mutações nesse gene em grande número de pacientes com HPN no Brasil. Na prática médica, é notado que os pacientes portadores de HPN apresentam-se clinicamente de forma muito heterogênea, com ampla variação na manifestação e intensidade de sintomas, na intensidade de hemólise e também na resposta ao eculizumabe, sendo percebido persistência de hemólise em alguns pacientes, com componente extravascular, cujo mecanismo ainda não é totalmente elucidado. Ainda não foi avaliada a possível associação entre mutações específicas do gene PIG-A e essas diferentes manifestações clínicas e laboratoriais da doença.

1.9. Metabolômica

O termo “ômica” refere-se a um campo de estudo que inclui genômica, proteômica e metabolômica. A genômica é o estudo em larga escala do genoma; a proteômica, o estudo em larga escala de proteínas. Metaboloma é o produto final da configuração genética de um organismo somado à influência de todos os fatores aos quais ele é exposto, tais como nutrição, ambiente e estilo de vida. Assim, o perfil metabolômico é capaz de fornecer uma medida funcional mais precisa de um fenótipo formado pelo resultado de mudanças genômicas, transcriptômicas e proteômicas. A metabolômica tem algumas vantagens em relação a abordagens genômicas e proteômicas: o metaboloma humano é significativamente menor (3-

4.000 metabólitos) e, portanto, mais simples de analisar em comparação com o genoma e proteoma, que compreendem aproximadamente 25.000 genes e 1.000.000 proteínas, respectivamente. As alterações no genoma e no proteoma nem sempre se relacionam com o fenótipo clínico devido a mecanismos homeostáticos. Assim, pode-se considerar o metaboloma como uma impressão digital química única derivada funções enzimáticas proteicas específicas ⁶⁷.

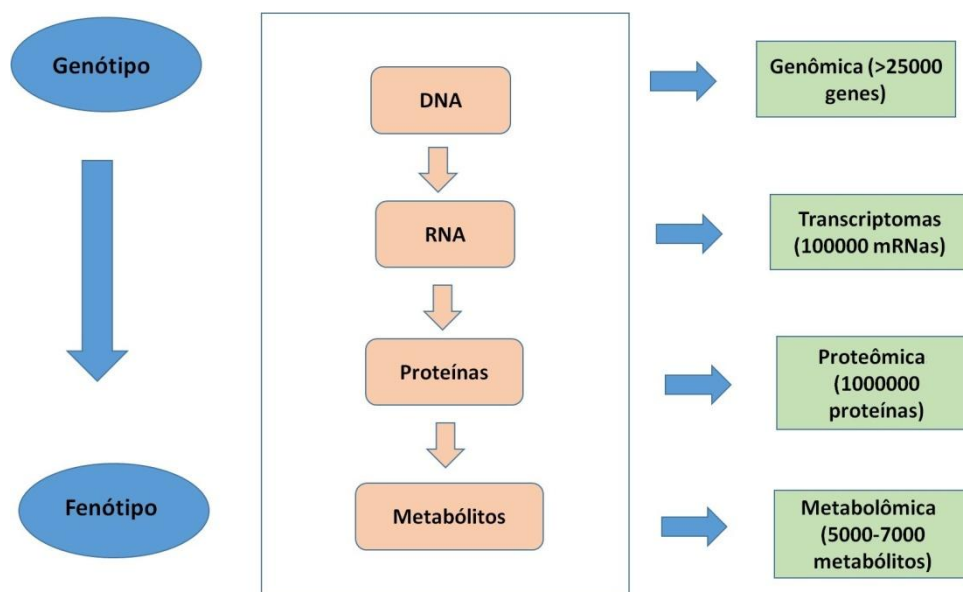


Figura 2. Abordagem das “ômicas”

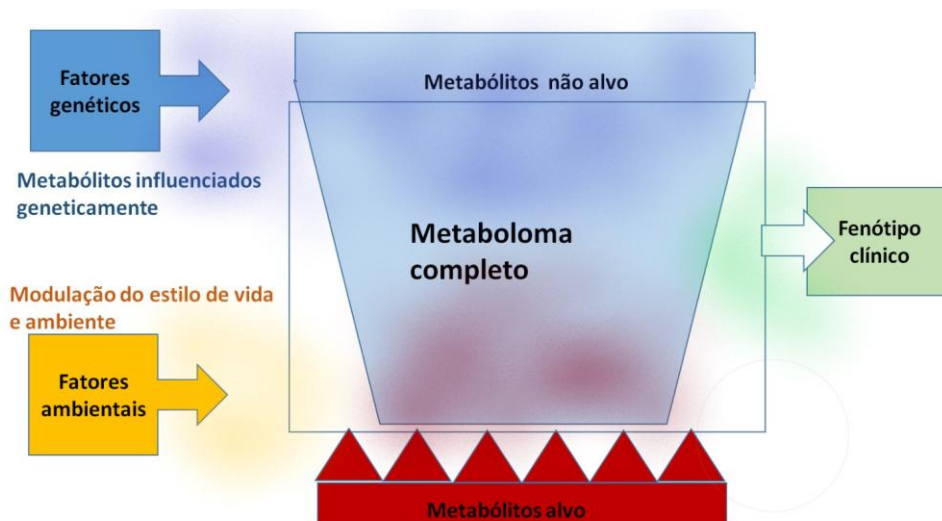


Figura 3. O metaboloma representa os pontos finais biológicos e a força motriz de fenótipos. Metabólitos não alvo podem analisar um subconjunto mais abrangente; já os metabólitos alvo quantificam moléculas de vias pré-selecionadas e conhecidas. Adaptado de Adamski, 2013⁶⁸.

O estudo metabolômico consiste na identificação e quantificação de pequenas moléculas em fluidos biológicos como sangue, urina ou tecidos e pode mostrar diferenças críticas entre produtos de tecidos doentes ou saudáveis. Atualmente, a metabolômica vem sendo estudada em inúmeras doenças, como neoplasias, doenças metabólicas, doenças infecciosas e autoimunes, servindo como um caminho para melhor compreensão do estado bioquímico e descoberta de biomarcadores de um determinado grupo de pacientes. Os estudos metabolômicos de quantificação absoluta ($\mu\text{M/L}$), em especial aqueles que se utilizam de estratégia alvo acoplada a espectrometria de massas, propiciam resultados onde a sensibilidade é seguida de especificidade igualmente elevada, de modo a propiciar a fenotipagem bioquímica de uma determinada condição.

Ao longo das duas últimas décadas, a espectrometria de massa emergiu como o principal método utilizado na análise, permitindo a caracterização estrutural e quantificação de metabolomas. A análise por esta plataforma consiste na geração de íons baseados em compostos (orgânicos ou inorgânicos) através de um método de ionização apropriado. Posteriormente, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga, num analisador de massas e detectada qualitativa e quantitativamente através de um detector que conta os íons. O tipo de ionização mais utilizado é a espectrometria de massa por ionização por *electrospray*, que tem sido uma das tecnologias mais populares e poderosas para a análise quantitativa, devido às suas muitas vantagens técnicas, incluindo capacidade de separação, maiores bibliotecas de espectro, robustez e sensibilidade⁶⁷.

De quatro tipos de moléculas biológicas que formam o corpo humano, ácidos nucleicos, aminoácidos, carboidratos e lipídios, este último tem se destacado. Suas funções foram inicialmente relacionadas à composição de membranas biológicas e armazenamento de energia, mas foi visto que há também interação com proteínas e formas de sinalização, incluindo a regulação genética e funções relacionadas à homeostase.

Fosfatidilcolinas e lisofosfatidilcolinas são importantes membros da família dos glicerofosfolipídios. As fosfatidilcolinas têm um papel estrutural indispensável em todas as membranas celulares, como aquelas que circundam as células e as organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, retículos liso e rugoso, peroxissomos); lipoproteínas, surfactantes naturais, bile, entre outros¹¹⁵. A fosfatidilcolina é um

glicerofosfolipídio com dois ácidos graxos ligados à uma molécula de glicerol, bem como uma ligação fosfodiéster que liga o grupo hidroxil à colina. Esse tipo de lipídeo pode ser do tipo éter lipídeo por possuir uma ligação do tipo éter entre dois dos seus constituintes, ou seja, entre um ácido graxo e o glicerol (PCAE). De um modo geral todos os lipídios que contêm mais do que 36 carbonos são considerados estruturais. Assim, as fosfatidilcolinas (Acil-Acil ou AA), os fosfatidilinositois, os esfingolipídios com mais de 36 carbonos também têm grande chance de pertencer as membranas. Metabólitos dos esfingolipídios têm sido referenciados como importantes moduladores da sobrevivência, crescimento celular, migração e angiogênese⁶⁹.

A β -oxidação é um processo catabólico de ácidos graxos que consiste na sua oxidação mitocondrial, sendo uma via metabólica importante na produção de adenosina trifosfato (ATP), manutenção da energia e homeostase do organismo. É particularmente importante para alguns órgãos que exigem muita energia, como coração e músculo esquelético, e fornece o principal suprimento de energia durante o jejum prolongado. A principal função da carnitina é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a matriz mitocondrial, onde ocorre a β -oxidação. A enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT I), localizada na região mitocondrial externa da membrana, catalisa a transferência de grupos acila de colesterol aciltransferase (acil-CoA) para sintetizar acilcarnitina e para produzir CoA livre. A enzima acilcarnitina / carnitina translocase, localizada dentro da membrana mitocondrial interna, troca acilcarnitina e carnitina citoplasmáticas por acilcarnitina e carnitina livre mitocondriais. A presença de um fosfolipídio específico da membrana mitocondrial, a cardiolipina, é necessária para a atividade da carnitina translocase. Finalmente, a enzima carnitina palmitoiltransferase II (CPT II), localizada no lado da matriz membrana mitocondrial interna, catalisa uma reação que é o inverso do CPT I, reconvertendo a acilcarnitina em acil-CoA, transportada para β -oxidação, enquanto a carnitina livre é produzida. No processo de β -oxidação, os ácidos graxos sofrem remoção, por oxidação, de sucessivas unidades de dois átomos de carbono, participando desse processo desidrogenases de acil-CoA, hidratases, tiolases, até chegar na forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), que entra na via do ciclo de Krebs para formação de energia (figuras 4 e 5).

Outras funções da carnitina incluem a modulação da relação acil-CoA / CoA, armazenamento de energia como acetilcarnitina e modular os efeitos tóxicos de

grupos acilo pouco metabolizados, ligando-os e excretando-os como ésteres de carnitina na urina⁷⁰. A razão normal de acilcarnitina para L-carnitina é de 0,25; razão maior ou igual a 0,4 é considerada anormal⁷⁰. Assim, a carnitina e seus derivados de acilcarnitina são importantes para produção de energia a partir de ácidos graxos. Desregulação da carnitina e dos níveis de acilcarnitina causam efeitos prejudiciais nos órgãos que dependem da oxidação de ácidos graxos para energia, como o coração e músculo.

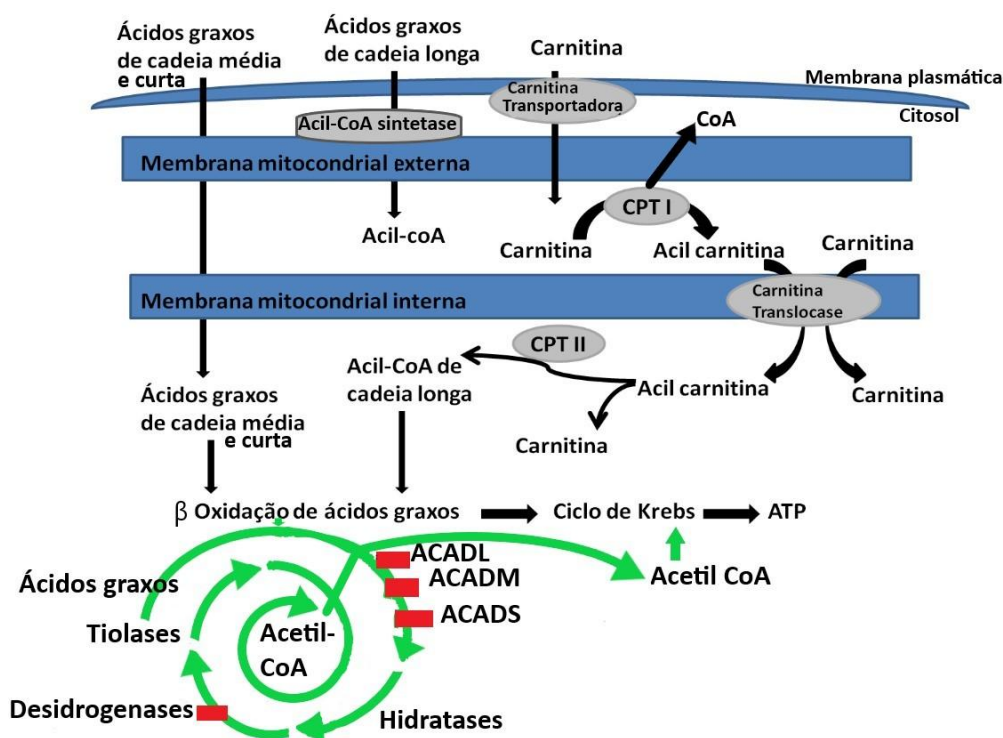


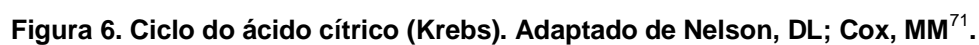
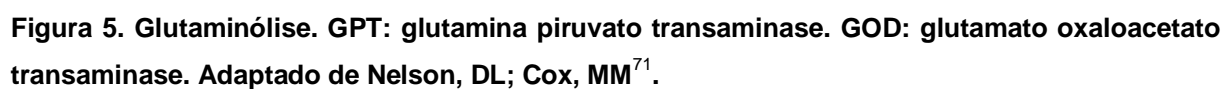
Figura 4. Sistema mitocondrial da carnitina e beta oxidação dos lipídeos. CPT: carnitina palmitoiltransferase. ACADL: desidrogenases de acil-CoA de cadeia longa; ACADM: desidrogenases de acil-CoA de cadeia média; ACADS: desidrogenases de acil-CoA de cadeia curta. Adaptado de Nelson, DL; Cox, MM⁷¹.

No campo da oncologia, a fenotipagem bioquímica tem ganhado destaque pois a regulação e dinâmica das vias metabólicas centrais diferem significativamente entre células normais e células neoplásicas. As células neoplásicas exibem aumento do metabolismo da glicose e da glutamina para alimentar suas demandas bioenergéticas e biossintéticas.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante na circulação e no ambiente intracelular. Não é apenas um precursor para a síntese de aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, mas também desempenha um papel regulador em vários processos incluindo metabolismo (por exemplo, combustão oxidativa, precursor gluconeogênico e precursor lipogênico), integridade celular (apoptose e proliferação celular), síntese e degradação proteica, potencial de oxidação, resistência à insulina e síntese de matriz extracelular. A glutamina demonstrou regular a expressão de muitos genes relacionados com o metabolismo, transdução de sinal, defesa e reparo, e ativar vias de sinalização intracelular⁷². O glutamato é um aminoácido não essencial e serve como o principal substrato bioenergético para a proliferação de célula, e funciona também como um neurotransmissor excitatório que desempenha papéis essenciais na função metabólica.

A glutaminólise é uma série de reações bioquímicas pelas quais a glutamina é degradada em glutamato, aspartato, CO₂, piruvato, lactato, alanina e citrato (figura 5). Uma vez que entra nas células, a maioria da glutamina doa nitrogênio a macromoléculas ou é desamidada pelas glutaminases, que converte glutamina em glutamato, que é transformado pela glutamato desidrogenase em alfa-cetoglutarato. Este intermediário pode reabastecer o ciclo de Krebs, produzindo oxalacetato, ou ser expulso para fora das mitocôndrias, e colaborar na produção de transaminase, em reações que produzem aspartato e piruvato (figuras 5 e 6). A ciclização do glutamato também produz prolina, um aminoácido importante para a síntese de colágeno e tecido conjuntivo⁶⁹.

A conversão de glutamina e glutamato é tipicamente bidirecional. A glutamina também fornece uma grande proporção de citrato, através da glutaminólise. O citrato subsequentemente sustenta a síntese lipídica de novo, a via da DHL e da cascata de transaminases, em uma direção que consome glutamina e alanina (figuras 5 e 6).



As propriedades aumentadas de glicólise aeróbica, que mostram o consumo de glicose e a conversão em lactato mesmo com a disponibilidade de oxigênio, são denominadas efeito de Warburg. No entanto, o aumento da glicólise por si só é insuficiente para atender às demandas metabólicas totais das células neoplásicas em proliferação. Estas também dependem da glutaminólise, que cataboliza a glutamina para gerar ATP e manter a função mitocondrial. A glutaminólise elevada também tem sido considerada uma importante característica do câncer, sendo comum o consumo de glutamina, responsável pelo transporte de nitrogênio sérico, e de alanina, proveniente da proteólise muscular, favorecendo a caquexia, comumente vista nestes pacientes⁶⁹.

A conversão da glutamina em glutamato, catalisada pela glutaminase (GLS; a primeira enzima na glutaminólise) é um processo chave para biossíntese da glutatona. Existem dois subtipos diferentes de GLS: GLS1 (renal) e GLS2 (hepática). A expressão elevada de GLS1 tem sido observada em vários tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, câncer de próstata e câncer de mama. Além disso, foi relatado que múltiplos fatores genéticos estão implicados na regulação da expressão de GLS1 e do metabolismo da glutamina. O myc, como proto-oncogene, estimula a captação e o catabolismo da glutamina⁶⁹.

No campo da hematologia também há diversos trabalhos estudando as metabólômicas. Foram dosados os metabólitos de 229 pacientes com LMA *de novo* e comparados com 260 controles⁷³. Níveis séricos aumentados de piruvato e 2-oxoglutarato em pacientes com LMA sugeriram uma atividade anaplerótica em células leucêmicas. A redução do fosfato de D-ribose no soro de pacientes com LMA sugeriu aumento da síntese de purinas. A análise da via metabólica sugeriu que diversas vias de metabolismo de aminoácidos foram aceleradas para aumentar a produção de piruvato, necessário para respiração e produção mitocondrial. Ácidos graxos livres, intermediários na síntese de ácidos graxos insaturados, foram encontrados em menor quantidade no soro dos pacientes, indicando consumo de ácidos graxos para a síntese lipídica de células leucêmicas. Um perfil de seis metabólitos foi utilizado para a criação de um escore de risco, independente de outros marcadores moleculares e citogenéticos. *In vitro*, o aumento da glicólise foi associado a uma menor sensibilidade à citarabina, e a inibição da glicólise teve um papel na redução da proliferação de blastos e melhorou os efeitos citotóxicos da

citarabina. Estes achados sugerem a utilização de metabólitos como novos marcadores prognósticos e fonte de estudo para potenciais alvos terapêuticos para a LMA.

Em gamopatias monoclonais, incluindo gamopatia monoclonal de significado indeterminado, mieloma múltiplo recém diagnosticado e mieloma múltiplo refratário, foram encontrados 57 metabólitos alterados, incluindo aumento de acilcarnitinas de cadeia longa, principalmente no grupo de mieloma refratário, indicando déficit na beta oxidação de lipídeos; redução de leucina, isoleucina e valina; redução de lisofosfatidilcolinas, importante aumento da razão quinurenina/triptofano, indicando ativação da via da quinurenina; aumento de glutamato, indicando aumento da glutaminólise, condição vista comumente em neoplasias⁷⁴.

Um estudo mostrou as acilcarnitinas 10:1 e 16:1 reduzidas no plasma do grupo de pacientes com tromboembolismo venoso quando comparado a controles. Acilcarnitinas de cadeia longa como 10:1, 12:0, 12:2, 18:1 e 18:2 também estão reduzidas em pacientes com TEV. A inibição do fator Xa pelas acilcarnitinas é maior pelas de cadeia longa, sendo sugerido que estas podem interferir na interação de Xa e protrombina. Há estudos que mostram atividade anticoagulante da acilcarnitina 16:0 quando na ausência de fator Va ou fosfolípidos⁷⁵.

Foram identificados vinte e três metabólitos distintos em um estudo que avaliou quarenta pacientes com anemia aplásica. Quando comparado com o grupo controle, os níveis de L-ornitina, L-prolina, L-glutamina, L-tirosina, creatinina, L-metionina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina e L-triptofano foram maiores em pacientes com anemia aplásica, enquanto os níveis de ácido cítrico, ácido succínico e ácido isocítrico (que fazem parte da glicólise e do ciclo de Krebs) foram menores⁷⁶. Os níveis mais baixos de ácido cítrico, ácido succínico e ácido isocítrico limitam a oferta de energia celular, que pode interromper a sinalização celular, interromper a diferenciação celular e até mesmo induzir a apoptose. Já o aumento de aminoácidos pode refletir distúrbios nos transportadores de membrana, em especial o sistema de transporte ABC (*ATP binding cassette*)⁷⁶.

O perfil metabolômico é especialmente interessante para analisar os eritrócitos, onde a avaliação de expressão gênica não é possível de ser realizada devido a ausência do núcleo. Análise dos metabólitos de eritrócitos de 28 pacientes⁷⁷ com anemia falciforme mostrou resultados interessantes, como aumento

de produtos intermediários da via glicolítica e pentose-fosfato; aumento de malato, acúmulo de intermediários do metabolismo de ascorbato, diminuição dos níveis de glutathione, envolvida no controle oxidativo; acúmulo de carnitinas, que podem estar ligadas a aumento de renovação de membrana celular (figura 7); aumento de aminoácidos glutamina, glutamato e glicina; e alteração de produtos do metabolismo de arginina e óxido nítrico, como aumento do catabolismo da ornitina e consequente aumento de espermina e espermidina e diminuição de citrulina, este último podendo ser um marcador de vasculopatia (figura 8).

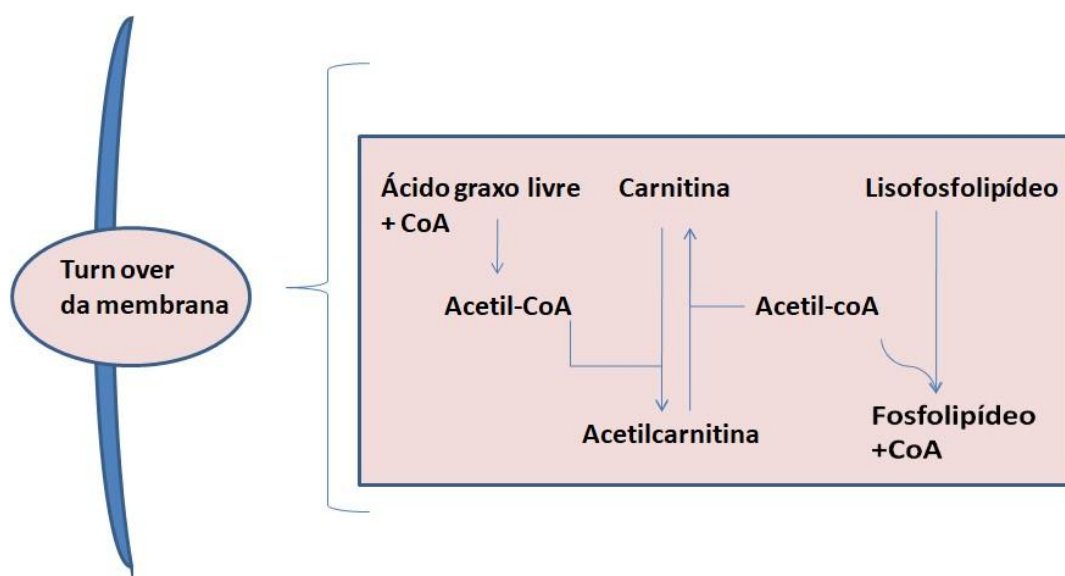


Figura7. Papel do metabolismo das carnitinas no turnover de membrana. Adaptado de Darghout et al⁷⁷.

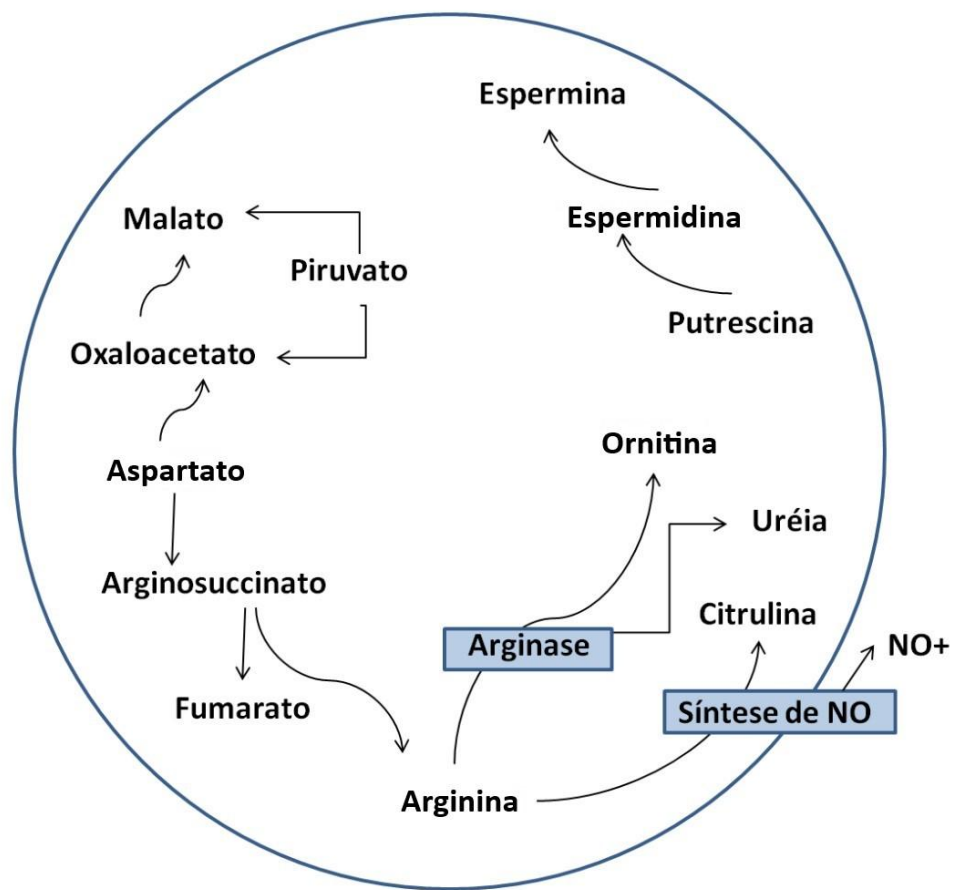


Figura 8. Metabolismo da arginina e das poliaminas. NO: óxido nítrico. Adaptado de Darghout et al⁷⁷.

A arginina é substrato na síntese de óxido nítrico e espécies reativas de nitrogênio. A degradação de arginina pela arginase eritrocitária gera ornitina, um metabólito que é o precursor da síntese de poliaminas e quando degradado, gera putrescina e, posteriormente, espermina e espermidina.

A comparação de perfil metabolômico entre hemácias de indivíduos saudáveis e de pacientes com doença falciforme mostrou que a esfingosina quinase-1 eritrocitária, responsável por manter a concentração de esfingosina-1-fosfato, um lipídeo bioativo presente em eritrócitos, está significativamente elevado em hemácias e plasma de pacientes com doença falciforme. A esfingosina 1-fosfato tem um papel importante na regulação de muitos processos biológicos, incluindo inflamação, angiogênese, injúria endotelial e trombose⁷⁸.

Um estudo que avaliou 20 pacientes⁷⁹ com doença falciforme HbS/Beta talassemia (HbS / β Thal), encontrou em comparação aos controles 17 metabólitos com concentração significativamente menor, 10 metabólitos com concentração aumentada e 23 metabólitos com concentrações significativamente maiores. Os aminoácidos L-arginina e L-ornitina foram significativamente menores nos pacientes HbS / β Thal ($p < 0,001$), enquanto a carnitina, acetilcarnitina e propionilcarnitina correlacionaram-se significativamente com o índice de produção de reticulócitos ($p < 0,001$).

Musharraf et al⁸⁰ avaliaram o soro de cem pacientes com β -talassemia maior, encontrando 40 metabólitos com diferença significativa em relação aos controles, sendo 17 aumentados e 23 reduzidos. Avaliando 45 pacientes⁸¹ com β - talassemia maior com dependência transfusional, foram encontrados valores de carnitina livre, acilcarnitinas de cadeia curta e longa e nível total de acilcarnitina significativamente mais baixos nos pacientes ($p < 0,005$). Curiosamente as acilcarnitinas de cadeia média hexanoilcarnitina (C6) e decanoilcarnitina (C10) encontravam-se elevadas ($p < 0,005$), sugerindo que sua produção era mantida pelos peroxissomos. Além disso, uma deficiente taxa de oxidação de ácidos graxos foi detectada nos pacientes, sugerindo menor atividade da carnitina palmitoiltransferase-1.

Um estudo metabolômico⁸² no soro de 40 pacientes com diagnóstico de β -talassemia antes e após a administração de hidroxureia mostrou que 25 metabólitos, alterados antes da terapia nos pacientes, começou a tender para valores semelhantes ao grupo saudável, mostrando o papel benéfico da medicação.

Gomes⁸³ estudou o perfil metabolômico de 31 pacientes com diagnóstico de anemia hemolítica auto imune (AHAI), encontrando um perfil metabolômico distinto do grupo controle, com aumento de acilcarnitinas de cadeia longa: hexadecanoilcarnitina (C16), hexadecenoilcarnitina (C16:1) e acilcarnitinas de

cadeia média: nonanoilcarnitina (C9) e hexenoilcarnitina (C6:1); aumento de fosfatidilcolinas, dimetilarginina assimétrica (ADMA) e esfingomielinas. Estes metabólitos podem estar relacionados a maior susceptibilidade à autoimunidade devido seus papéis na regulação de linfócitos e macrófagos. Houve aumento também de poliaminas (espermina e espermidina) no grupo de pacientes com AHA em atividade hemolítica, provavelmente pelo maior catabolismo de ornitina. No seu trabalho, a relação entre as fosfatidilcolinas “PC ae 34:3 / PC ae 40:2” foi preditora de recaída com especificidade de 81% e sensibilidade de 100%.

Embora existam trabalhos mostrando perfil metabolômico alterado em doenças hemolíticas, não há descrição ainda de metabolômica em pacientes com HPN, que pode ter outras manifestações além da hemólise, relacionadas a insuficiência medular e trombose. Assim, a avaliação de perfil metabolômico em pacientes com HPN pode ser útil em revelar biomarcadores relacionados a doença, vias metabólicas alteradas e assim fornecer uma melhor compreensão quanto às diferentes manifestações clínicas e até mesmo novas possibilidades terapêuticas.

2. Objetivos

2.0. Objetivos

- 1) Analisar as características clínico-laboratoriais de pacientes com HPN clássica, HPN associada a outra doença hematológica ou HPN subclínica.
- 2) Avaliar as mutações do gene PIG-A e possíveis correlações com as manifestações clínicas de pacientes com HPN.
- 3) Comparar o perfil metabólico de pacientes com HPN hemolítica (clássica e HPN associada a outra doença hematológica) com controles saudáveis.
- 4) Comparar o perfil metabólico de pacientes com HPN hemolítica antes e após a aplicação de eculizumabe.

3. Pacientes e métodos

3.0. Métodos

3.1. Casuística

Foram incluídos 109 pacientes acompanhados na disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) ou no serviço de Hematologia do Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês diagnosticados entre janeiro de 1987 e julho de 2018.

A maioria dos pacientes incluídos no estudo (n=96) foram acompanhados prospectivamente desde a inclusão e os dados clínicos e laboratoriais foram revistos e conferidos com o paciente em consultas periódicas. Os demais pacientes (n=13) que haviam falecido ou que perderam seguimento tiveram seus dados clínicos e laboratoriais colhidos retrospectivamente pelo prontuário físico e/ou eletrônico das duas instituições.

Para o sequenciamento do gene PIG-A e estudo metabolômico, foram incluídos 31 pacientes com HPN hemolíticas que estavam em acompanhamento regular nos dois centros no período de 2015 a 2016.

Todos os pacientes concordaram em participar do estudo e foram incluídos após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) devidamente aprovado pelos comitês de ética das instituições participantes. A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos sugeridos pela declaração de Helsinque.

3.2. Parâmetros clínicos avaliados

Os dados clínicos foram coletados através de fichas padronizadas (anexo), preenchidas de acordo com os registros de prontuário e informações fornecidas pelos pacientes.

A coleta de dados incluía as seguintes informações: identificação do paciente, dados da doença (data e método do diagnóstico), classificação da doença, sintomas e sinais de hemólise (dor abdominal, hemoglobinúria, disfagia, fadiga), tromboembolismo venoso ou arterial, necessidades transfusionais, hospitalizações, função hepática e renal, tamanho do clone HPN e tratamento instituído.

Todos os dados clínicos foram verificados e inseridos no banco de dados pelo grupo de pesquisadores responsáveis pelo estudo na UNIFESP.

3.3. Critérios de Inclusão

- Pacientes com 18 anos ou mais, que assinarem do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I);
- Presença de clone HPN identificado e quantificado por citometria de fluxo multiparamétrica.
- Diagnóstico de HPN clássica, HPN associada a outra doença hematológica ou HPN subclínica.

3.4. Critérios de Exclusão

- Insuficiência de dados clínicos: pacientes cujas fichas de coletas de dados estavam incompletas em relação aos dados mínimos;
- Incapacidade de compreensão do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.5. Amostras:

3.5.1. Pesquisa clone HPN:

A pesquisa de clone HPN foi realizada em todos os 109 pacientes por citometria de fluxo multiparamétrica. Os exames foram realizados no laboratório de Citometria de Fluxo da UNIFESP sob a supervisão da Profa. Mihoko Yamamoto ou no Laboratório de Citometria de Fluxo do Fleury Medicina e Saúde sob a supervisão do Prof. Matheus Vescovi Gonçalves e do Prof. Alex Freire Sandes.

Foi colhido 1 (um) tubo de 3 mL de sangue periférico com anticoagulante EDTA potássico. Para a caracterização fenotípica foi empregada técnica de imunofluorescência direta, com marcação tripla. A expressão das diferentes proteínas foi estudada por citometria de fluxo. Todos os pacientes possuíam ao menos uma pesquisa de clone HPN por citometria de fluxo, realizada ao diagnóstico ou em algum momento durante o acompanhamento, já que faz parte da rotina do ambulatório reavaliar o clone HPN uma vez por ano para acompanhamento.

Para a avaliação dos neutrófilos e monócitos, 100 µL da amostra de sangue foram adicionados à um tubo contendo os anticorpos monoclonais FLAER-Alexa 488 (Cedarlane), CD 157 (BD, clone BP3), CD14 PE (BD, Clone MOP9), CD45 PerCP (BD, Clone 2D1), CD33 APC (BD, Clone P67.6) e CD24 (Abnova, Clone ALB9). Foi incubado a temperatura ambiente, por 15 minutos e protegido da luz. Após adição

de solução para lise das hemácias, as amostras eram incubadas por mais 10 minutos nas mesmas condições anteriores, centrifugadas 2 vezes por 5 minutos a 1500 rpm e ressuspensas em 250 µL de solução tampão fosfato salino (PBS). Já a marcação de hemácias foi realizada sem lise celular, com 5 µL da amostra marcadas com CD59PE (clone 282H19). Foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos, realizada a lavagem do material com PBS e então centrifugado (1500rpm por 5 minutos). O *pellet* final foi ressuspendido em PBS e adquirido no citômetro de fluxo.

As amostras foram captadas (250.000 eventos) no citômetro de fluxo de quatro cores *FACSCalibur*® (BD Biosciences, San Jose, EUA), e analisadas no programa Infinicyt™ software (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

O controle de qualidade era feito com calibração diária com o reagente *CaliBRITE*™ BD, e a compensação dos fluorocromos seguia as normas do fabricante.

O clone HPN foi considerado presente quando identificadas mais que **0,01%** de células hematopoiéticas com expressão deficiente nos antígenos ligados ao GPI, CD157, FLAER e CD59, dos antígenos CD14 em monócitos, e CD24 em neutrófilos. Ao menos dois destes marcadores deveriam estar deficientes, em pelo menos duas linhagens hematopoéticas distintas.

3.5.2. Extração do DNA Genômico para o estudo do gene PIG-A

O estudo do gene PIG-A foi realizado em 31 pacientes. A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Sírio Libanês de Ensino e Pesquisa sob a supervisão da Profa. Fabiana Bettoni. Foram coletadas amostras de sangue periférico (10-20ml), sendo acondicionados em tubos contendo EDTA. Os tubos foram centrifugados a 800x G (força gravitacional) por 10 minutos a temperatura de 4°C para separar o plasma. Para extração de *buffy coat*, o anel de leucócitos foi coletado com uma pipeta de Pasteur e transferido a um tubo *ependorf* de 2ml. Após essa etapa, foi realizada lise das hemácias adicionando-se 1 ml de tampão de lise de hemácias (*red blood cell Lysis buffer* (RBLB), centrifugando-se o tubo a 400x G por 10 minutos em temperatura ambiente.

Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado novamente o 1ml de RBLB, ressuspendendo o *pellet* com cuidado. Feito nova centrifugação a 400x G por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante e adicionado 1 ml da

solução PBS, novamente centrifugado a 400x G por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, após repetição do passo anterior, o *buffy coat* foi ressuspenso em uma solução de 400 µL de glicerol e estocado a -80 °C até o processamento.

O DNA foi extraído do *buffy coat* com QIAmp DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) usando a automação QIAcube (Qiagen, Courtaboeuf, France).

3.5.3. Estudo do Gene PIG-A

O sequenciamento do gene PIG-A foi inicialmente realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Sírio Libanês de Ensino e Pesquisa sob a supervisão da Profa. Fabiana Bettoni e posteriormente o sequenciamento de todos os casos foi feito para confirmação e maior detalhamento no Laboratório de Biologia Molecular e Diagnóstico Molecular de Doenças Lisossômicas da UNIFESP sob a supervisão do Prof. João Bosco Pesquero. O gene PIG-A foi sequenciado pelo método de Sanger a partir da amplificação de fragmentos utilizando-se os *primers* descritos por Iida et al⁵ e um *primer* desenhado no laboratório para melhor avaliação do éxon 6 (tabela 1). Os desenhos dos oligonucleotídeos foram baseados na sequência referência do gene *PIG-A* depositada no GenBank (Accession number NG_009786) com o auxílio do software Geneious R10.

Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a amplificar as regiões codificantes, flanqueadoras e sítios de *splicing* do gene *PIGA*, com o auxílio de ferramentas de análise de qualidade de oligonucleotídeos dos bancos de dados/softwares: OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies – IDT), Blast (NCBI) e UCSC *In-silico* PCR (UCSC Genome Browser). As sequências dos oligonucleotídeos desenhados foram utilizados nas etapas de reação de amplificação dos fragmentos e no sequenciamento.

Tabela1 – Primers utilizados na amplificação do gene PIG-A

Fragmento	Primer Sense	Primer Antisense	Região analisada (GRCh38/hg38 Assembly)	Éxon analisado	Produto de amplificação (pares de base)
I	5' cagacctcgatgtttccctcag 3'	5' agaacagccccatccgaaagcg 3'	chrX:15335439-15336103	1	665
II	5' gagctgagatcctgttttactct 3'	5' gaaaaagaactatgtgaatggat 3'	chrX:15331536-15332022	2	487
III	5' tcgaaaaggcatccgttac 3' **	5' gccaaacaatcattatatacaag 3'	chrX:15331131-15331703	2	573
IV	5' tggattctcagtcgttctggtga 3'	5' cttctccctcaagacaacatgaa 3'	chrX:15325879-15326122	3	244
V	5' tcactcctttctcccctctc 3'	5' gtacgtgaacatcaagtaagag 3'	chrX:15324608-15325187	4 and 5	580
VI	5' ggtcattgtttatcatgggacag 3'	5' gggtatttccatagcttttatag 3'	chrX:15321485-15321845	6	406

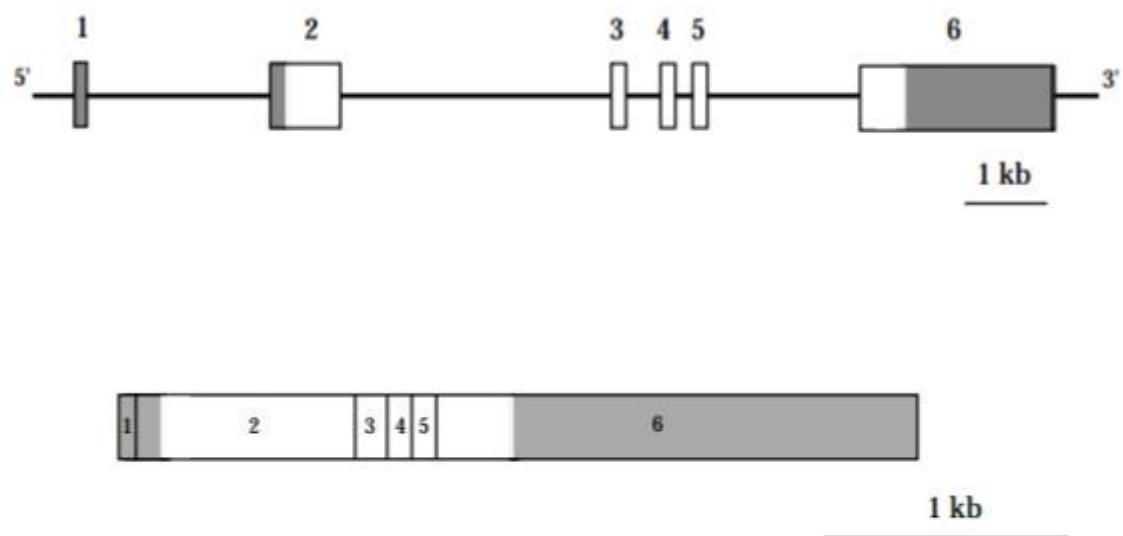


Figura 9. Representação esquemática do gene PIG-A. A figura superior representa a estrutura do gene PIG-A. Os seis éxons estão representados conforme a numeração de cada um, sendo que as áreas cinzas indicam a região não codificante. A figura abaixo mostra a estrutura do PIG-A cDNA. A região não transcrita 5' (éxon 1 e 5' do éxon 2) e a região não transcrita 3' (final 3' do éxon 6) estão representadas em cinza⁸⁴.

3.6. Identificação das mutações

3.6.1 - Reação de amplificação dos fragmentos

Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos descritos anteriormente (0.20 μ M cada), Master Mix *Gotaq Green* (Promega™) e o termociclador Veriti (Applied Biosystems™) de acordo com as instruções dos fabricantes.

As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C (veja tabela 1) e 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 6 minutos a 72 °C.

3.6.2 - Eletroforese em gel de agarose

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen), aplicando uma voltagem de 130V por 15 minutos, utilizando tampão de corrida TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA) e intercalante de ácidos nucléicos Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogen).

3.6.3 Purificação do DNA amplificado

Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados. A purificação dos fragmentos amplificados foi realizada com um protocolo padronizado no laboratório. O protocolo é baseado no congelamento da amostra a -80°C ou em nitrogênio líquido, seguido de centrifugação a 12000 RCF por 10 minutos. A amostra do DNA amplificado se separa do gel no sobrenadante, pronto para a etapa posterior (sequenciamento).

3.6.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com o reagente *Big Dye Terminator* V3 (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante, sendo utilizado o termociclador Veriti (Applied Biosystems) e oligonucleotídeos específicos que foram desenhados, conforme descrito anteriormente.

3.6.5 Precipitação do DNA

A precipitação do DNA foi realizada por meio de protocolo padronizado no laboratório com as seguintes etapas:

Para cada placa de 96 poços foram utilizados 5mL de etanol 100%, 200µL de acetato (3M), 200µL de solução EDTA (125mM), 30µL deste mix foi adicionado em cada poço, seguido de agitação. A placa permanece protegida da luz por 15 minutos. Após essa etapa foi realizada centrifugação por 30 minutos a 15000 RCF a 16°C. A mistura anteriormente adicionada foi descartada por inversão de placa, e em seguida adicionado 35µL de etanol 75% em cada poço. A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos, a 1500xG - 16°C e o etanol descartado por inversão.

A placa é incubada por 3 minutos a 90°C para a evaporação de qualquer resquício de etanol e em seguida são adicionados 10µL de formamida em cada poço. A placa foi selada com uma septa e incubada novamente por 2 minutos a 95°C. Posteriormente foi dado um choque térmico no gelo/freezer de 30 segundos.

3.6.6 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram lidas no sequenciador automático por eletroforese capilar, no equipamento *ABI 3500 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), no qual foram produzidos os eletroferogramas para a análise das sequências.

3.6.7 Análise de dados

Os eletroferogramas foram alinhados contra a sequência referência do gene *PIG-A* depositada no GenBank (*Accession number* NG_009786) e analisados com o auxílio do software Geneious R10 (Biomatters). Após a análise, foi realizada uma busca nos bancos de dados Clinvar, dbSNP e HGMD para verificar a patogenicidade das mutações. Para as variantes sem descrição na literatura foram realizadas uma análise de predição de patogenicidade nos softwares *Mutation Taster*, *Polyphen 2* e *Human Splicing Finder*.

3.7. Predição de patogenicidade da mutação

Foi predita a patogenicidade das mutações encontradas utilizando-se a análise *in silico* (uso de ferramentas computacionais que utilizam algoritmos para

identificar e prever o impacto da mutação na proteína) pelos seguintes programas, já bem estabelecidas na literatura:

- *ClinVar*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>): trata-se de arquivo público do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com acesso livre. O banco de dados inclui variantes germinativas e somáticas de qualquer tamanho, tipo ou localização genômica. As interpretações são submetidas por laboratórios de testes clínicos, laboratórios de pesquisa, bancos de dados específicos de *locus*, OMIM®, *GeneReviews*™, *UniProt*, painéis de especialistas e diretrizes práticas.

- dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>): Banco de dados de polimorfismos de nucleotídeo único e múltiplas variações de pequena escala que incluem inserções / deleções, microssatélites e variantes não polimórficas.

- *Human Gene Mutation Database* - HGMD® (<http://www.hgmd.org>): Base de Dados de Gene e Mutação Humana. Registra todas as mutações nas células de linhagem germinativa que ocasionam doenças e todos os polimorfismos funcionais associados a doença descritos na literatura. Os dados constam de substituições de nucleotídeo único na região codificante, de regiões regulatórias e de splicing dos genes nucleares humanos, de microdeleções e micro-inserções, in-dels, desenvolvimento de repetições, assim como alterações genéticas grosseiras (deleções, inserções e duplicações) e complexos rearranjos do gene.

- *Mutation Taster* (www.mutationtaster.org): projetado para prever as consequências de substituições de aminoácidos, alterações intrônicas, pequenas inserções ou deleções e alterações abrangendo as bordas íntron-éxon. O programa inclui todos os SNPs e INDELS (inserção e deleção) do Projeto *1000 Genomes*, bem como variantes de doenças conhecidas contidas no *ClinVar*3 e *HGMD Public*4.

- *Polymorphism Phenotyping version 2* (PolyPhen-2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>): software de predição de patogenicidade através da avaliação do possível impacto na substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana. Tem funções como realizar anotações funcionais de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), mapas que codificam

SNPs para transcritos de genes, extrai anotações de sequências de proteínas e atributos estruturais e constrói perfis de conservação. Com a combinação destas ferramentas, o programa é capaz de estimar a probabilidade de uma mutação missense ser prejudicial.

- *Human splicing finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>): ferramenta útil para avaliar mutações intrônicas que podem ocasionar defeitos no splicing.

A frequência alélica foi determinada com o auxílio do *1000 genomes* (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) e do *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>).

3.8. Espectrometria de massa para análise da metabolômica

Para a análise de metabolômica, foram incluídos o mesmo grupo de 31 pacientes que realizaram o estudo do gene *PIG-A*. O processamento foi realizado no laboratório Biocrates em Innsbruck, na Áustria, e analisado sob a supervisão do Prof. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva no Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP.

Foram coletadas em tubos de EDTA amostras de sangue periférico (10 ml) de todos os pacientes. Em 12 pacientes que estavam em uso de eculizumabe, coletamos também amostras imediatamente antes da aplicação do eculizumabe e 24 horas após a administração.

Os tubos foram centrifugados a 800x G (força gravitacional) por 10 minutos a temperatura de 4°C para separar o plasma. Estas amostras foram congeladas a -80°C em criotubos e enviadas para o laboratório Biocrates, Innsbruck, Áustria. A realização de cromatografia líquida com espectrometria de massa foi feita utilizando-se o kit AbsoluteIDQ P180 Biocrates (Biocrates, Life Science AG, Innsbruck, Áustria), sendo identificados e quantificados 186 metabólitos de 7 classes distintas (40 acilcarnitinas, 21 aminoácidos, 19 aminas biogênicas, soma das hexoses, 76 fosfatidilcolinas, 14 lisofosfatidilcolinas e 15 esfingomielinas). Os glicerofosfolipídios foram diferenciados com relação à presença de ligações éster (a) e éter (e) na porção glicerol, onde duas letras indicam que duas posições de glicerol estão ligadas a um resíduo de ácido graxo (aa = diacil, ae = acil-alquila), enquanto uma

única letra indica a presença de um único resíduo de ácido graxo (a = acila ou e = alquila). As concentrações de todos os metabólitos analisados foram relatadas em μM , obtidas através de perfil quantitativo direcionado por espectrometria de massa em tandem de ionização por electrospray (ESI). Foi utilizado um espectrômetro de massa SCIEX 4000 QTrap® (SCIEX, Darmstadt, Alemanha). As amostras de plasma foram analisadas de forma centralizada, independente, isentas de qualquer informação de fenótipo durante a análise, na plataforma quantitativa de metabolômica da Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria. As técnicas de mensuração dos metabólitos avaliados estão descritas detalhadamente na página <http://www.freepatentsonline.com/20070004044.html>. Resumidamente, um esquema de perfil direcionado foi usado para pesquisar quantitativamente os metabólitos anotados usando testes de monitoração de reação múltipla, perda neutra e íons precursores. A quantificação das concentrações de metabólitos e a avaliação do controle de qualidade foi realizada com o pacote de software MetIQ (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria).

Os resultados dos pacientes com HPN foram comparados com os de 166 adultos saudáveis oriundos de um estudo populacional que avaliou moradores de São Paulo, dentre os quais 54% eram do sexo masculino, utilizados nesse estudo como grupo controle.

3.9. Análise dos resultados

Mediana e variação foram usadas para análise descritiva de variáveis contínuas, enquanto as variáveis categóricas foram apresentadas em porcentagem. A probabilidade de sobrevida global (SG) foi calculada pelo método estimativo de Kaplan-Meier. As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS® (SPSS Inc., Chicago).

Para a análise de dados metabólicos, foi aplicada a transformação logarítmica a todos os metabólitos quantificados (normalização das distribuições de concentração). Os dados foram importados para o site analítico MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.ca) e ROC CET: ROC Curve Explorer & Tester (<http://www.rocet.ca/ROC CET/>) para a geração de curvas Univariadas e Multivariadas de Característica Operacional do Receptor (ROC). O MetaboAnalyst é

uma ferramenta que oferece várias opções para processamento de dados metabolômicos, normatização de dados, análise estatística multivariada, representação gráfica, identificação de metabólitos e mapeamento de vias. Este software suporta técnicas tais como: testes t, métodos quimiométricos de classificação supervisionados, como a PLS-DA, que usa a técnica de regressão linear múltipla para encontrar a direção da covariância máxima entre um conjunto de dados (X) e a associação à classe (Y); e não supervisionados (PCA). Para avaliar a significância estatística de cada modelo, os cálculos do ROC incluíram: Monte-Carlo Cross Validation (MCCV) usando subamostragem balanceada, onde dois terços (2/3) das amostras foram utilizados para avaliar a importância do fator avaliado. Características significativas foram usadas para construir modelos de classificação, que foram validados no terço das amostras que foram excluídas na primeira análise. Este mesmo procedimento foi repetido 10-100 vezes para calcular o desempenho e intervalo de confiança de cada modelo. Para validar ainda mais a significância estatística de cada modelo, os cálculos ROC incluíram intervalos de confiança de 95% para a especificidade do modelo desejado, além de precisão após 1000 permutações e cálculo de taxas de falsa descoberta (FDR – *false discovery rate*). Para todos os testes, os valores de P inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos.

4.Resultados

4.0. Resultados

4.1. Pacientes estudados

Foram avaliados no total 109 pacientes: 58 (54%) pacientes da UNIFESP e 51 (46%) pacientes do Hospital Sírio Libanês. As características clínicas dos pacientes incluídos estão ilustradas nas tabelas de número 2 a 7.

A mediana de idade foi de 39 anos, variando de 18 a 81 anos. Cinquenta e quatro pacientes (50%) eram do sexo masculino. Quarenta e quatro pacientes (40%) possuíam o diagnóstico de HPN clássica (grupo 1), doze pacientes (11%) possuíam HPN associada a outra doença hematológica (grupo 2) e cinquenta e três pacientes (49%) apresentavam HPN subclínica (grupo 3). Dentre as doenças hematológicas associadas aos grupos 2 e 3, a mais comum foi anemia aplásica (95%). Outros diagnósticos foram síndromes mielodisplásicas e trombocitemia essencial. O tempo de seguimento de todos os pacientes teve uma mediana de 60 meses, variando de 3 a 394 meses. Nove pacientes (8%) evoluíram a óbito. A sobrevida global em 5 anos foi de 100% para o grupo 1, 89% para o grupo 3 e 71% para o grupo 2 (figura 5A).

Tabela 2. Características clínicas dos 109 pacientes incluídos

Características	
Número de pacientes.	109
Idade ao diagnóstico em anos, mediana (variação)	39 (18-81)
Pacientes masculinos, no. (%)	54 (50)
Diagnóstico, no. (%)	
<i>Anemia Aplásica com pequeno clone HPN</i>	53 (49)
<i>HPN clássica</i>	44 (40)
<i>HPN hemolítica associada a outra doença hematológica</i>	12 (11)
Doença hematológica associada (n=65), no. (%)	
<i>Anemia aplásica</i>	62 (95)
<i>Síndrome mielodisplásica</i>	2 (3)
<i>Trombocitemia essencial</i>	1 (2)
Tempo de seguimento em meses, mediana (variação)	60 (3-394)

4.2. HPN hemolítica

Os pacientes com HPN hemolítica (grupo 1 e 2, n=56), representados na tabela 3, apresentaram mediana de idade de 41 anos, com variação entre 23 a 81 anos. Vinte e oito pacientes (50%) eram do sexo masculino. Os pacientes com HPN hemolítica apresentavam caracteristicamente clones grandes: mediana de 86 % em monócitos, variando de 21% a 99,9%, 78 % em granulócitos, variando de 10% a 99,9% e 31 % em hemácias, variando de 5% a 98%. As manifestações clínicas incluíam: fadiga, sintoma mais comum, relatado em 48 pacientes (86%), urina escura ou hemoglobinúria em 37 (66%), dor abdominal em 25 (45%), cefaleia em 16 (28%) e disfagia em 9 (16%). Seis pacientes (21%) dentre os 28 do sexo masculino relataram disfunção erétil, sendo este um sintoma difícil de ser avaliado pois nem todos os pacientes se sentiram confortáveis em abordar o assunto.

No grupo de HPN hemolítica, 14 pacientes (25%), sendo dez do grupo 1 e quatro do grupo 2, tiveram diagnóstico de tromboembolismo venoso. Nove pacientes abriram o quadro com evento trombótico: dois pacientes apresentaram um evento entre 30-60 dias após o diagnóstico, e três pacientes após um ano do diagnóstico. Sete pacientes tiveram trombose abdominal, com síndrome de Budd-Chiari em quatro pacientes. Quatro pacientes apresentaram trombose venosa profunda de membros inferiores e um paciente teve tromboembolismo pulmonar. Uma paciente teve trombose venosa cerebral. Dois pacientes evoluíram com mais de um evento trombótico, mesmo em vigência de anticoagulação com varfarina. Sete pacientes (13%) apresentaram eventos arteriais: cinco pacientes com diagnóstico de acidente vascular encefálico isquêmico e dois pacientes, acidente isquêmico transitório. Todos estes pacientes apresentaram a trombose antes do tratamento específico, e não foram relatados novos eventos venosos ou arteriais após o início do eculizumabe ou da anticoagulação profilática primária, rotina nos dois serviços desde 2009. Desde então, não houve nenhum caso de trombose e apenas dois óbitos foram registrados, ambos em pacientes do grupo 2 e por consequência de infecções relacionadas às citopenias.

A mediana de hemoglobina ao diagnóstico foi 9,1 g/dL, variando de 4,4g/dL a 13,6 g/dL. Quarenta e um pacientes (73%) apresentaram necessidade transfusional de hemácias. A mediana de neutrófilos foi de 1.885/mm³, variando de 450/mm³ a 6.520/mm³ e a mediana de plaquetas foi de 110.000/mm³, variando de 8000/mm³ a

829.000/mm³. Em relação às provas de hemólise, a mediana de reticulócitos foi de 117.400/mm³, variando de 6.100/mm³ a 600.000/mm³, a mediana de bilirrubina indireta foi de 0,73 mg/dL variando de 0,14 mg/dL a 9,3 mg/dL. A DHL ao diagnóstico teve uma mediana de 4,17 vezes maior que o valor de referência, variando de 1,76 até 9,3, com mediana de valor total de 1551 mg/dL, variando de 390 mg/dL a 3.989 mg/dL.

O valor de creatinina ao diagnóstico teve mediana de 0,9 mg/dL (valor de referência até 1,1 mg/dL para mulheres e 1,3 mg/dL para homens), variando de 0,49 mg/dL a 1,5 mg/dL. Assim, apenas três pacientes apresentaram creatinina acima do valor de referência para o sexo. Cinco pacientes (9%) necessitaram de terapia dialítica em algum momento na evolução da doença, sempre associada a intensa crise de hemólise. Todos recuperaram a função renal após a resolução da crise hemolítica.

Anticoagulação foi prescrita em 37 (67%) pacientes em algum momento do acompanhamento, tendo sido realizada com antagonista de vitamina K, inibidor de fator Xa ou heparina de baixo peso molecular.

Dos pacientes que fizeram uso de imunossupressor, 22 (40%) receberam corticoterapia, oito (14%) fizeram tratamento com timoglobulina associada a ciclosporina e seis (11%) receberam alentuzumabe e ciclosporina.

O tempo de seguimento médio neste grupo foi de 85 meses, variando de 3 mês a 376 meses. A sobrevida global no grupo 1 foi de 100% em 5 anos (figura 10A). O grupo 2 foi o que teve pior sobrevida, de 71% em 5 anos, com quatro óbitos: nenhum destes 4 pacientes chegou a receber o eculizumabe.

Quarenta e um pacientes (73%) fizeram uso de eculizumabe e suas características serão descritas a seguir. Quinze pacientes (27%) não receberam tratamento com eculizumabe. Destes, quatro (27%) evoluíram a óbito. Uma paciente faleceu devido a insuficiência hepática após Budd-Chiari, uma paciente por complicações decorrentes de AVC isquêmico, e dois pacientes por neutropenia febril. Dos outros onze pacientes vivos, oito estão à espera do fornecimento do eculizumabe, e outros três tiveram redução espontânea do clone e consequente melhora de hemólise, não necessitando de tratamento no momento.

A curva de sobrevida global dos pacientes tratados ou não tratados com eculizumabe (dentre os 56 com indicação por HPN hemolítica) está apresentada na figura 10B. A sobrevida global foi de 100% naqueles tratados e 43% nos que não receberam eculizumabe ($P < 0,0001$, figura 10B). Todos os pacientes que faleceram eram do grupo 2 e todos os óbitos foram relacionados às citopenias. Entretanto, se separamos apenas os pacientes do grupo 1 (HPN clássica), não houve nenhum óbito em ambos os grupos. Dos 44 pacientes desse grupo, 35 (80%) tiveram acesso a eculizumabe ao longo de sua doença e 9 (20%) ainda não tiveram acesso, tendo sido expostos apenas a anticoagulação e medidas de suporte (orientações, hidratação e vigilância intensiva durante as crises de hemólise).

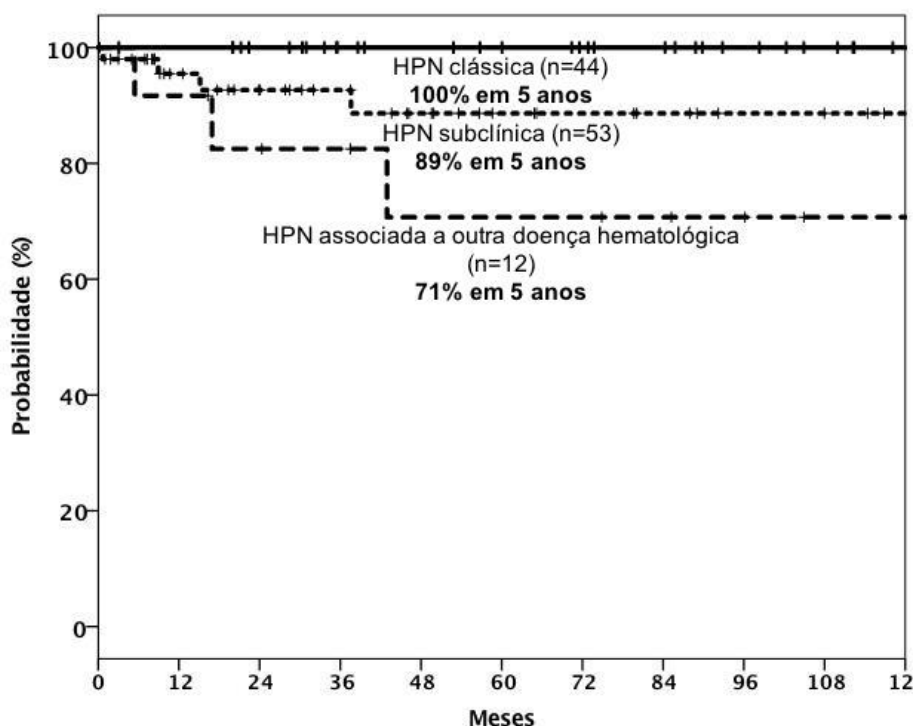


Figura 10A. Sobrevida global dos 109 pacientes com HPN separados em HPN clássica (grupo 1, n=44), HPN subclínica (grupo 2, n=53) e HPN associada a outra doença hematológica (grupo 3, n=12)

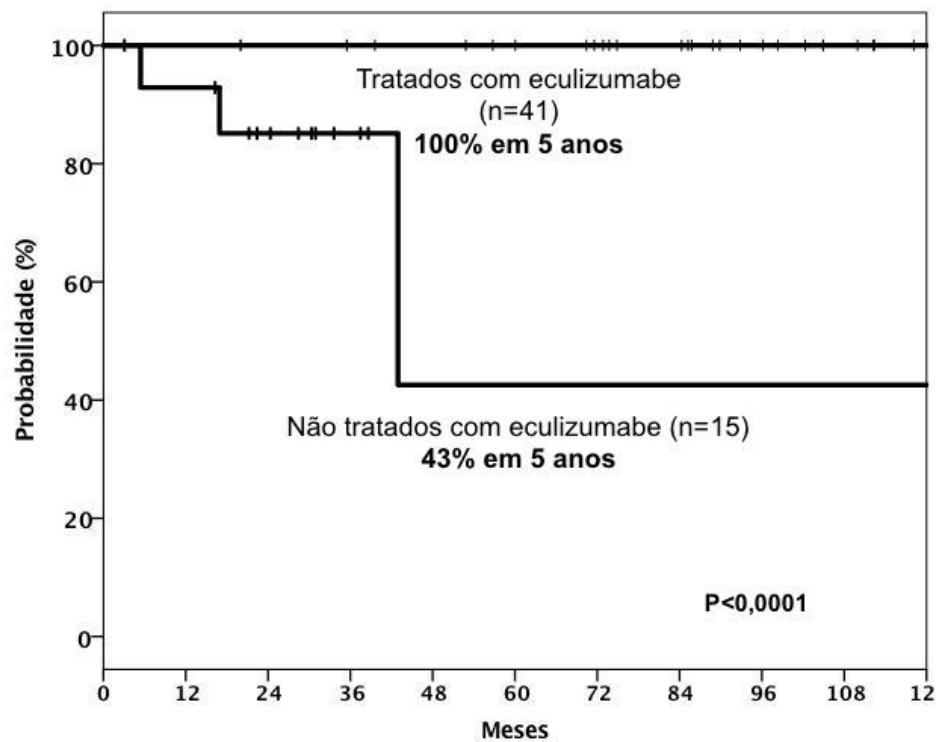


Figura 10B. Sobrevida global dos 56 pacientes com HPN hemolítica que receberam (n=41) ou não receberam (n=15) tratamento com eculizumabe.

Tabela 3. Características clínicas dos 56 pacientes com HPN hemolítica, associada ou não a outra doença hematológica

Características	
Número de pacientes.	56
Idade ao diagnóstico em anos, mediana (variação)	41 (23-81)
Pacientes masculinos, no. (%)	28 (50)
Diagnóstico, no. (%)	
<i>HPN clássica</i>	44 (79)
<i>HPN associada a outra doença hematológica</i>	12 (21)
Doença hematológica associada, no. (%)	
<i>Anemia aplásica</i>	11 (92)
<i>Trombocitemia essencial</i>	1 (8)
Sintomas iniciais ao diagnóstico, no. (%)	
<i>Fadiga</i>	48 (86)
<i>Hemoglobinúria</i>	37 (66)
<i>Dor abdominal</i>	25 (45)
<i>Cefaleia</i>	16 (28)
<i>Disfagia</i>	9 (16)
Complicações, no. (%)	
<i>Necessidade transfusional</i>	41 (73)
<i>Trombose venosa</i>	14 (25)
<i>Abdominal</i>	7 (50)
<i>TVP/TEP</i>	5 (36)
<i>Outros</i>	2 (14)
<i>Trombose arterial</i>	7 (13)
<i>AVC</i>	5 (71)
<i>AIT</i>	2 (29)
Tamanho do clone na primeira avaliação, % (variação)	
<i>Glóbulos vermelhos</i>	31 (5 - 98)
<i>Neutrófilos</i>	78 (10 - 99,9)
<i>Monócitos</i>	86 (21 - 99,9)
Hemoglobina ao diagnóstico (g/dL)	9,1 (4,4 - 13,6)
Reticulócitos ao diagnóstico (/mm³)	117400 (6100 - 600000)
Leucócitos ao diagnóstico (/mm³)	4005 (960 - 14200)
Neutrófilos ao diagnóstico (/mm³)	1885 (450 - 6520)
Plaquetas ao diagnóstico (/mm³)	110000 (8000 - 829000)
DHL ao diagnóstico (UI/L)	1551 (390 - 3989)
Veze o valor de referência	4,17 (1,76 - 9,3)
Creatinina ao diagnóstico (mg/dL)	0,9 (0,49 - 1,51)
Bilirrubina indireta ao diagnóstico (mg/dL)	0,73 (0,14 - 9,3)
Tratamento, no. (%)	
<i>Eculizumabe</i>	41 (73)
<i>Anticoagulação</i>	37 (67)
<i>Corticosteroides</i>	22 (40)
<i>Timoglobulina e ciclosporina</i>	8 (14)
<i>Ciclosporina +/- alentuzumabe</i>	6 (11)
<i>Transplante de medula óssea alogênico</i>	2 (4)
Tempo de seguimento em meses, mediana (variação)	85 (3 - 376)

4.3. Pacientes em tratamento com eculizumabe

O tratamento com eculizumabe foi realizado em 41 (73%) dos pacientes com HPN hemolítica (grupos 1 e 2). A mediana de tempo do diagnóstico até o início do tratamento com eculizumabe foi de 24 meses, variando de 2 a 275 meses. A mediana de tempo de uso do eculizumabe foi de 82 meses, variando de 2 a 125 meses.

Após o uso de eculizumabe, houve melhora dos níveis hematimétricos, conforme apresentado na tabela 5. Houve aumento da mediana de hemoglobina de 9,2 g/dL para 10,5 g/dl. Grande parte dos pacientes (94%) obtiveram independência transfusional, com sobrevida livre de transfusão de 92% em cinco anos. Entretanto, 6% dos pacientes ainda apresentam necessidade transfusional, geralmente após crise de hemólise desencadeada por infecção ou por atraso do medicamento. Todos relataram melhora significativa dos sintomas associados a HPN, como fadiga, dor abdominal e hemoglobinúria, mesmo aqueles que ainda permaneceram com anemia. A DHL foi o parâmetro de hemólise que teve redução mais significativa, passando de uma mediana de 4,17 vezes para 0,98 vezes o valor de referência. Somente um paciente teve valor de DHL acima de 1,5 vez o valor de referência, sendo que esse paciente estava em uso irregular de medicação.

Dentre os 41 pacientes tratados, 30 pacientes (73%) não normalizaram o valor da Hb. Além disso, apesar da normalização da DHL, 81% dos pacientes mantiveram reticulocitose e 76% mantiveram hiperbilirrubinemia indireta, demonstrando persistência de hemólise extravascular após o tratamento.

Dos 41 pacientes, 34 (83%) realizaram o TAD após o início do tratamento com eculizumabe. Destes, 16 pacientes (47%) apresentaram teste positivo. Em todos os casos, a positividade do TAD era para o C3 no monoespecífico. Não houve casos de positividade de IgG. Não houve diferença significativa nos níveis de Hb, plaquetas, bilirrubina indireta, haptoglobina e DHL entre o grupo TAD positivo e negativo (tabela 6). Entretanto, o grupo TAD positivo apresentou maior reticulocitose (108.000/mm³ vs. 275.000/mm³, p=0,03).

Entretanto, apesar da persistência da hemólise extravascular, apenas quatro pacientes foram transfundidos após o início do eculizumabe (ainda que esporadicamente – uma ou duas vezes ao ano): uma paciente por manter intensa hemólise extravascular, uma paciente por concomitância de insuficiência medular, e

dois por uso irregular do eculizumabe por falta de fornecimento. Três pacientes não apresentaram resposta adequada na dose habitual de 900 mg e precisaram receber o eculizumabe em dosagem maior (1200 mg).

Nenhum paciente teve infecção meningocócica. Todos os pacientes receberam vacina meningocócica (pelo menos 15 dias antes de iniciar o medicamento) e todos receberam profilaxia com penicilina V oral ou penicilina benzatina, ou com macrolídeos em caso de alergia a penicilina, conforme recomendações internacionais. Nenhum paciente evoluiu para síndrome mielodisplásica. Nenhum paciente apresentou evento vascular arterial ou venoso até o momento. Apenas um paciente evoluiu para aplasia, tendo sido então suspenso o eculizumabe e o paciente encaminhado para transplante alogênico.

Quatro pacientes interromperam o uso do eculizumabe após o início do tratamento. Dois pacientes interromperam o uso pois foram submetidos a TCPH alogênico: um com 14 meses após o início do eculizumabe e o outro com 70 meses. A indicação do transplante do primeiro paciente foi devido a evolução para aplasia (caso supracitado) e do segundo por crises de hemólise frequentes com necessidade de transfusão por falta no fornecimento do medicamento. Ambos estão vivos e clinicamente bem, respectivamente 5 anos e 1 ano e 2 meses após o transplante. O paciente transplantado mais recentemente apresenta doença do enxerto contra o hospedeiro crônica leve com acometimento cutâneo e ocular.

Os outros dois pacientes tiveram o uso suspenso devido à redução do tamanho de clone HPN para menos de 10% (de 66% para 5% em monócitos em um caso e de 92% para 3% em monócitos no outro caso), com normalização das provas de hemólise e do hemograma: um paciente após 6 anos e outro após 8 anos do uso do anticorpo monoclonal, respectivamente.

Tabela 4. Características clínicas dos 41 pacientes com HPN em uso de eculizumabe.

Características	
Número de pacientes	41
Idade ao diagnóstico em anos, mediana (variação)	35 (18-80)
Pacientes masculinos, no. (%)	24 (58)
Tempo entre o diagnóstico e o início do eculizumabe, em meses, mediana (variação)	24 (2-275)
Tempo de uso do eculizumabe em meses, mediana (variação)	82 (2-125)
Pacientes que interromperam o uso, no. (%)	4 (10)

Tabela 5. Comparação de valores laboratoriais antes e após o eculizumabe nos 41 pacientes tratados com eculizumabe.

	Antes	Após	p
Hemoglobina (g/dL) mediana, (variação)	9,2 (4,7- 13,6)	10,5 (8- 15,9)	0,001
Reticulócitos (/mm ³) mediana, (variação)	119500 (61000- 600000)	179000 (59000- 669000)	0,23
DHL (UI/L) mediana, (variação)	1863 (400-3928)	442 (223- 795)	<0,0001
X valor de referência, mediana, (variação)	4,17 (1,76 - 9,3)	0,98 (0,5 – 1,77)	
Bilirrubina indireta (mg/dL) mediana, (variação)	0,32 (0,2- 3,7)	0,7 (0,2-11)	0,24
Plaquetas (/mm ³) mediana, (variação)	117000 (10000- 233000)	125000 (27000- 298000)	0,04

Tabela 6. Comparação de valores laboratoriais entre pacientes TAD positivo e negativo nos pacientes tratados com eculizumabe.

	TAD +	TAD -	p
Hemoglobina (g/dL)	10	11,1	0.84
VCM	103	101	0.08
Plaquetas (/mm ³)	137000	102000	0.06
Reticulócitos (/mm ³)	272000	108000	0.03
DHL (UI/L)	458	414	0.79
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,97	0,60	0,35

4.4. HPN subclínica

Os pacientes com HPN subclínica (grupo 3, n=53), representados na tabela 4, apresentaram mediana de idade de 35 anos, variando de 18 a 80 anos. Vinte e seis pacientes (49%) eram do sexo masculino. Os pacientes deste grupo apresentavam predominantemente clones pequenos: mediana de 3,4% em monócitos, variando de 0,02% a 25%; 2,0% em granulócitos, variando de 0,01% a 27% e 0,24% em hemácias, variando de 0,01% a 32%.

As complicações neste grupo de pacientes incluíram manifestações hemorrágicas em 27 pacientes (51%) e complicações infecciosas com necessidade de antibioticoterapia em 19 pacientes (36%). Dois pacientes apresentaram trombose: uma paciente teve trombose venosa profunda e estava em uso de anticoncepcional oral; a segunda paciente teve trombose de veia renal, associada a pielonefrite.

Vinte e oito pacientes (54%) apresentaram necessidade transfusional de plaquetas e vinte e cinco pacientes (48%), necessidade transfusional de hemácias. A mediana de hemoglobina ao diagnóstico foi 8,9 g/dl, variando de 4,3 g/dl a 14,4 g/dL. A mediana de neutrófilos foi de 1023/mm³, variando de 40/mm³ a 2650/mm³, a mediana de plaquetas de 19.500/mm³, variando de 2.000/mm³ a 378.000/mm³, a mediana de reticulócitos de 46.000/mm³, variando de 2.600/mm³ a 128.000/mm³ e a mediana de bilirrubina indireta foi de 0,3 mg/dL variando de 0,1 mg/dL a 1,1 mg/dL. A mediana da DHL ao diagnóstico foi de 0,7 vezes o valor de referência, variando de 0,5 até 2,0, com mediana de valor de 278 mg/dL, variando de 110 mg/dL a 612 mg/dL.

Dos pacientes que fizeram uso de imunossupressor, dez (19%) receberam alentuzumabe e ciclosporina, nove (17%) fizeram tratamento com timoglobulina associada a ciclosporina, cinco (10%) receberam ciclosporina isolada. Dois pacientes (4%) receberam eltrombopague e cinco pacientes (10%) receberam outros tratamentos, que incluíram uso de danazol e corticoide isolados. Seis pacientes (12%) foram submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCHT) alogênico. Outros quinze pacientes (29%) não tiveram necessidade de tratamento específico.

O tempo de seguimento médio neste grupo foi de 32 meses, variando de 3 a 394 meses. A sobrevida global foi de 89% em 5 anos. Cinco pacientes (9%)

evoluíram a óbito, sendo quatro pacientes por neutropenia febril durante o tratamento de imunossupressão e uma paciente por neutropenia febril, reativação de citomegalovírus e Epstein Barr vírus após TCPH alogênico.

Tabela 7. Características clínicas dos 53 pacientes com HPN subclínica

Características	
Número de pacientes.	53
Idade ao diagnóstico em anos, mediana (variação)	35 (18-80)
Pacientes masculinos, no. (%)	25 (48)
Doença hematológica associada, no. (%)	
<i>Anemia aplásica</i>	50(96)
<i>Síndrome mielodisplásica</i>	2 (4)
Complicações, no. (%)	
<i>Sangramento</i>	27 (52)
<i>Infecção</i>	19 (36)
<i>Trombose</i>	2 (4)
<i>Necessidade transfusional de hemácias</i>	25 (48)
<i>Necessidade transfusional de plaquetas</i>	28 (54)
Tamanho do clone na primeira avaliação, % (variação)	
<i>Glóbulos vermelhos</i>	0,24 (0,01-32)
<i>Neutrófilos</i>	2,00 (0,01-27)
<i>Monócitos</i>	3,4 (0,02-25)
Hemoglobina ao diagnóstico (g/dL)	8,9 (4,3- 14,4)
Reticulócitos ao diagnóstico (/mm³)	46000 (2600- 128000)
Leucócitos ao diagnóstico (/mm³)	3090 (390-5300)
Neutrófilos ao diagnóstico (/mm³)	1023 (40- 2650)
Plaquetas ao diagnóstico (/mm³)	19500 (2000- 378000)
DHL ao diagnóstico (UI/L)	278 (110-612)
Veze o valor de referência	0,7 (0,5 - 2)
Creatinina ao diagnóstico (mg/dL)	0,8 (0,5- 1,08)
Bilirrubina indireta ao diagnóstico (mg/dL)	0,3 (0,1- 1,1)
Tratamento, no. (%)	
<i>Alentuzumabe e ciclosporina</i>	10 (19)
<i>Timoglobulina e ciclosporina</i>	9 (17)
<i>Transplante de medula óssea alogênico</i>	6 (12)
<i>Ciclosporina</i>	5 (10)
<i>Eltrombopague</i>	2 (4)
<i>Outros</i>	5 (10)
<i>Nenhum</i>	15 (29)
Tempo de seguimento em meses, mediana (variação)	32 (3- 394)

4.5. Sequenciamento do gene PIG-A: Mutações encontradas

Detalhes das características clínicas de cada um dos 31 pacientes que tiveram o gene PIG-A estudado encontram-se na tabela 8. A mediana de idade foi de 31 anos, variando de 18 a 69 anos, sendo 17 pacientes do sexo masculino (55%). Vinte pacientes (65%) pertenciam ao grupo 1, três pacientes (9%) pertenciam ao grupo 2 e oito pacientes (26%) pertenciam ao grupo 3. As características clínicas desses 31 pacientes eram semelhantes às daquelas do total de 109 pacientes: 16 pacientes (73%) dentre os 23 pertencentes aos grupos de HPN hemolítica (grupos 1 e 2) relataram hemoglobinúria e onze (35%), dor abdominal. Vinte e cinco (80%) pacientes tinham necessidade transfusional. Oito pacientes apresentaram eventos trombóticos, sendo sete deles venosos e um arterial. Cinco pacientes apresentaram trombose venosa abdominal, incluindo Budd-Chiari em dois deles. A mediana de hemoglobina no momento da coleta de amostra foi de 11g/dL, variando entre 5,1 a 14,4 g/dL. A mediana de DHL foi de 449 mg/dL, variando de 222 a 1691 mg/dL. Os pacientes apresentavam clones HPN: mediana de 72,5 % em monócitos, variando de 0,03 a 99,9%, 73 % em granulócitos, variando de 0,01 a 99,9% e 37 % em hemácias, variando de 0,01 a 95%.

Foram detectadas 29 variantes diferentes em 27 de 31 pacientes (tabela 9). Entre elas, três eram mutações já publicadas: c.55C>T (p.Arg19Trp), uma mutação em *missense* localizada no éxon 2, com troca de aminoácido arginina por triptofano, classificada como polimorfismo benigno, relatada por Nafa et al⁵⁴, Endo et al⁵⁶ e Mortazavi et al⁶⁰; c.577_581delGTACT, mutação em *frameshift* relatada por Mortazavi et al⁶⁰ e c.981+8G>A no íntron 4 relatada por Yamada et al⁵⁷. Encontramos uma mutação c.*7G>T relatada pelo *1000 Genomes* e dois polimorfismos de nucleotídeo único c.-116-311G>C e c.-116-13A>G encontrados na população geral e descritos no banco de dados do *Ensembl* e *1000 Genomes*. As demais 23 variantes encontradas eram novas mutações, sem descrição na literatura até o momento.

Foram observadas predominantemente mutações de ponto, sendo encontradas dezesseis mutações com simples troca de pares de bases, uma inserção, dez mutações com deleção pequenas, de 1 a 5 pares de bases, e somente uma deleção de maior tamanho, de 19 pares de bases. As alterações encontradas foram: doze mutações *frameshift* (42%), nove mutações *missense* (31%), duas

mutações em *splice site* (7%), uma mutação *nonsense* (3%) e cinco demais mutações (17%) que ocorreram em regiões não codificadoras.

As mutações encontradas do PIG-A distribuíram-se por todo o gene. Foram encontradas três mutações na região 5', dez mutações na região do éxon 2, duas mutações no éxon 3, cinco mutações no éxon 4, cinco mutações no éxon 5, uma mutação no íntron 2, duas mutações no íntron 4 e uma mutação na região 3'.

Quatro pacientes não tiveram nenhuma mutação detectada: dois deles com diagnóstico de HPN hemolítica e dois com anemia aplásica e pequeno clone.

As descrições de cada uma das mutações detectadas em cada paciente, como os aminoácidos, a posição genômica, a localização e o tipo de mutação estão detalhadas e especificadas na tabela 1a, na seção final de anexos.

4.6 . Análise *in silico*

O impacto das mutações encontradas nestes pacientes foi determinado através dos *softwares* descritos na metodologia. Os pacientes receberam um escore variando de 0 (benigno) a 1 (provavelmente patogênico).

A maioria (22 de 29) das variantes encontradas foram classificadas como de impacto provavelmente patogênico nos pacientes com HPN.

Vinte mutações exônicas receberam um escore de provavelmente patogênico. Houve uma divergência na mutação c.853C>G (p.Arg285Gly), sendo classificado pelo *Mutation taster* como provável patogênico com um escore de 0,9 e pelo *Polyphen 2* como benigno, com um escore de 0,266.

As mutações intrônicas foram avaliadas pelo *Human splice finder*, sendo a mutação c.981+8G>A classificada como sem impacto no *splicing* e as mutações c.715+1G>A e c.981+2T>C como provavelmente afetando o *splicing*, portanto com possível repercussão patológica.

Duas mutações foram classificadas como benignas: c.*7G>T e c.55C>T, esta última classificada como polimorfismo com vários relatos na literatura.

Três variantes em região 5' foram classificados como com efeito desconhecido: c.-116-104T>A, com incidência populacional desconhecida e c.-116-311G>C e c.-116-13A>G, ambos polimorfismos de nucleotídeo único com uma incidência populacional alta (tabela 9), o que pode indicar que provavelmente têm comportamento benigno.

Dos 23 pacientes com HPN hemolítica, 19 apresentavam pelo menos uma mutação classificada como patogênica. O paciente número 9 apresentava os polimorfismos c.55C>T (p.Arg19Trp) (descrito como benigno), c.-116-13A>G e c.-116-104T>A, ambas na região 5' (com comportamento desconhecido), e uma mutação c.981+8G>A no íntron 4 (no qual o preditor *Human splicing finder* considera não possuir impacto no splicing). Entretanto, esse caso chama atenção por apesar de apresentar somente mutações aparentemente sem impacto, trata-se de um paciente com quadro de HPN clássica, com hemólise importante e presença de grande clone HPN (99%). Do mesmo modo a paciente 26, HPN clássica, apresentava somente polimorfismos de nucleotídeo único na região 5': c.-116-311G>C e c.-116-13A>G, sem impacto clínico conhecido. Além desses dois casos, não encontramos qualquer mutação do gene PIG-A em dois pacientes com HPN hemolítica.

Quinze pacientes (65%) com HPN hemolítica apresentavam mais de uma mutação concomitante, sendo a maioria composta de mutação provavelmente patogênica associada a um polimorfismo. Cinco destes pacientes: 3, 5, 8, 10, 11, apresentavam mais de uma mutação provavelmente patogênica. Não foi encontrada qualquer associação entre o quadro clínico e o tipo ou o número de mutações.

Dentre as mutações descritas, três configuravam polimorfismos. Um polimorfismo c.55C>T (p.Arg19Trp) foi encontrado em três pacientes do grupo HPN hemolítica. Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) se repetiram com frequência: c.-116-13A>G, na região 5', foi demonstrada em 22 de 31 pacientes (70%), e c.-116-311G>C na região 5' foi encontrada em oito (26%) pacientes. Nos oito pacientes do grupo 3, HPN subclínica, foram encontrados somente estes dois SNPs.

No	Grupo	Idade	Sexo	TEV	TA	Local de trombose	Transusão	Hemoglobinúria	Dor abdominal	Ecuzumabe	IS	Hb diag	Hb pós	DHL diag	DHL pós	%Clone Granulócitos diag	%Clone Granulócitos pós	%Clone Monócitos diag	%Clone Monócitos pós
1	1	32	M	N	N		N	S	N	S	0	6,60	12,00	2.277	474	90,00	99,80	90,00	99,50
2	1	41	F	N	N		S	S	N	S	0	4,70	9,90	2.812	520	92,00	99,00	79,00	98,00
3	1	32	M	S	N	Mesentérica	S	N	S	S	1	9,40	12,80	1.455	387	70,00	98,00	100,00	98,00
4	1	34	F	N	N		N	S	S	S	1	10,70	10,50	1.891	624	70,00	71,00	81,00	74,00
5	2	25	M	N	N		S	N	N	S	4	5,90	11,00	1.603	493	55,00	62,70	98,00	95,40
6	1	57	F	N	N		S	S	N	S	1	9,20	9,90	3.989	379	99,56	97,00	99,86	99,70
7	1	39	F	S	N	MIE	S	S	S	S	1	9,19	10,00	3.720	277	73,81	55,00	90,50	45,00
8	1	61	F	N	N		S	S	N	S	1	11,10	8,10	978	539	70,00	99,50	98,00	99,50
9	1	27	M	N	N		S	S	S	S	1	9,10	8,70	2.133	435	84,00	99,00	86,00	99,00
10	1	30	M	N	N		S	S	N	S	1	8,10	11,50	3.323	612	99,00	90,00	93,00	90,00
11	1	39	F	S	N	Trombose venosa cerebral, esplênica, mesentérica	S	S	S	S	2	8,7	8,10	773	442	96,00	88,00	96,50	68,00
12	1	52	M	N	N		N	N	N	S	1	13,50	11,7	492	372	66,50	74,50	87,00	72,50
13	1	28	M	N	N		S	N	N	S	0	11,50	11,50	1.662	718	65,00	63,00	63,00	70,00
14	1	57	M	S	N	MSD, MIE, esplênica	S	S	S	S	1	9,60	13,50	2.586	369	82,00	18,00	92,00	32,00
15	1	37	M	N	N		S	S	S	S	1	12,20	12,7	3.783	449	90,00	94,00	80,00	94,00
16	3	51	M	N	N		S	N	N	N	6	7,20		533		0,14		0,13	
17	3	27	M	N	N		S	N	N	N	5	7,00		159		0,03		0,05	
18	3	22	F	N	N		N	N	N	N	0	14,40		516		6,90		10,70	
19	3	57	F	N	N		S	N	N	N	5	9,10		212		0,00		0,03	
20	2	72	M	N	N		S	N	N	N	5	7,80		242		19,60		21,00	
21	2	36	M	N	N		S	N	N	N	3	7,80		204		15,00		29,60	
22	3	25	F	N	N		S	N	N	N	5	12,00		372		4,60		3,40	
23	3	20	M	N	N		N	N	N	N	0	13,10		326		1,50		1,80	
24	1	40	M	S	S	Budd-Chiari, AVE	S	S	S	N	0	9,7		1836		89,00		15,00	
25	1	50	F	N	S	AIT	S	S	N	S	2	8,50	8,70	1.760	458	79,00	89,00	88,00	89,00
26	1	68	F	S	S	Budd-Chiari, AVE	S	S	S	S	1	6,60	13,50	2.504	486	56,00	30,00	88,00	33,00
27	2	64	F	N	N		S	S	N	S	2	7,8	7,2	520	411	36,00	99,98	52,00	99
28	1	30	M	S	N	MIE e MID	S	N	S	N	1	7,6		2.078		70,00		49,00	
29	1	36	M	N	N		S	S	S	S	1	13,60	12	407	223	95,00	97,90	99,00	98,90
30	3	19	F	N	N		S	N	N	N	0	8,60		413		3,40		7,90	
31	3	33	F	N	N		N	N	N	N	0	12,20		408		5,90		6,60	

Tabela 8. Detalhes dos pacientes cujo PIG-A foi analisado. Diagnóstico: 1- HPN clássica, 2- HPN associada a AA, 3- Clone HPN pequeno; TEV (tromboembolismo venoso), TA (tromboembolismo arterial); IS (imunossupressão): 0: nenhum, 1: corticoide, 2: corticoide+ ciclosporina, 3: timoglobulina+ ciclosporina, 4: timoglobulina+ ciclosporina + corticoide, 5: alentuzumabe+ ciclosporina, 6: ciclosporina+ danazol

Tabela 9. Detalhes das mutações encontradas

Região	Mutação	Troca de aminoácidos	Tipo de mutação	Predição de patogenicidade	Incidência populacional	Referência
5´	c.-116-104T>A			Mutation taster, polyphen 2: Desconhecido	-	Não descrita
5´	c.-116-311G>C			Mutation taster, polyphen 2: Desconhecido	G: 36% C: 64% (Ensembl)	Ensembl
5´	c.-116-13A>G			Mutation taster, polyphen 2: Desconhecido	T=0.1343/507 (1000 Genomes)	1000Genomes
Éxon 2	c.564T>G (P.Ser188Arg)	Ser→Arg	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99polyphen 2: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.549T>A (p.C183*)		Nonsense	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.264_265insA		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.234delA		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.55C>T (p.Arg19Trp)	Arg→Trp	Missense	Clinvar: Benigno; Mutation taster: Polimorfismo Polyphen 2: benigno	A=0.0246/93 (1000 Genomes)	Nafa et al ⁵⁴ , Endo et al ⁵⁶ e Mortazavi et al ⁶⁰
Éxon 2	c.577_581delGTACT		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Mortazavi et al ⁶⁰
Éxon 2	c.548G>A (p.Cys183Tyr)	Cys→Tyr	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99 Polyphen 2: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.142G>T (p.Gly48Cys)	Gly→Cys	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99 Polyphen 2: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.453delC		Frameshift	Mutationtaster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 2	c.336delG		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Íntron 2	c.715+1G>A		5´splice site	Human splicing finder, Provavelmente afeta o <i>splicing</i>	-	Não descrita
Éxon 3	c.840delG		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita

Região	Mutação	Troca de aminoácidos	Tipo de mutação	Predição de patogenicidade	Incidência populacional	Referência
Éxon 3	c.832delT		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 4	c.944G>T (p.Cys315Phe)	Cys→Phe	Missense	Mutation taster e polyphen 2: Provável patogênico 0,99	-	Não descrita
Éxon 4	c.878_896delAGGATGTTAGAAATGTCTT		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 4	c.908_909delAT		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 4	c.853C>G (p.Arg285Gly)	Arg→Gly	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,9 Polyphen 2: Benigno 0,266	-	Não descrita
Éxon 4	c.944G>A p.Cys315Tyr	Cys→Tyr	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99 Polyphen 2: Provável patogênico 0,96	-	Não descrita
Íntron 4	c.981+8G>A			Human splicing finder, provavelmente sem impacto no splicing	T=0.0003/24 (ExAC)	Yamada et al ⁵⁷
Íntron 4	c.981+2T>C		5'splice site	Clinvar: Desconhecido; Human splicing finder, provavelmente afeta o splicing	-	Não descrita
Éxon 5	c.1004G>A (p.Gly335Glu)	Gly→Glu	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99 Polyphen 2: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 5	c.983_985delTTG		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 0,99	-	Não descrita
Éxon 5	c.982G>T (p.V328F)	Val→Phe	Missense	Mutation taster: Provável patogênico 0,99	-	Não descrita
Éxon 5	c.984delT		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
Éxon 5	c.1049_1053delCTTCA		Frameshift	Mutation taster: Provável patogênico 1,0	-	Não descrita
3'UTR	c.*7G>T			Clinvar: benigno	A=0.0037/14 (1000 Genomes)	1000 Genomes

4.7. Metabolômica

Foram analisadas amostras dos mesmos 31 pacientes que tiveram o gene *PIG-A* sequenciado. Desses 31, 23 pacientes que apresentavam HPN hemolítica (sendo 19 pacientes com HPN clássica e quatro pacientes com HPN associada a outra doença hematológica) tiveram seus resultados comparados aos controles saudáveis. Dezenove pacientes estavam em uso de eculizumabe, sendo coletadas amostras imediatamente antes da infusão do medicamento e 24 horas após a administração em 12 destes pacientes. As características clínicas dos pacientes encontram-se na tabela 8. As amostras dos pacientes foram analisadas através do AbsolutIDQ 180 do Laboratório Biocrates e comparadas com os resultados de 166 adultos saudáveis, conforme descrito na metodologia.

Foi observado que, nos pacientes com HPN hemolítica, dos 186 metabólitos analisados, 92 deles (tabela 2a - anexos) apresentavam diferenças significativas entre pacientes e controles, com correlação positiva ou negativa (MetaboAnalyst 4.0). Os 25 metabólitos mais relevantes encontrados nos pacientes com HPN hemolítica estão descritos na Tabela 10. Os metabólitos do grupo das acilcarnitinas que estavam aumentados na HPN foram: hexenoilcarnitina: C6:1 (81% de correlação positiva com HPN), hidroxipalmitoilcarnitina: C16-OH (48%), palmitoilcarnitina: C16 (41%), palmitoleilcarnitina: C16:1 (37%), hexadecadienoilcarnitina: C16:2 (38%), esteroilcarnitina: C18 (44%), oleilcarnitina: C18:1 (42%), linoleilcarnitina: C18:2 (32%), hidroxipropionilcarnitina: C3-OH (38%).

Os metabólitos do grupo acilcarnitinas reduzidos na HPN foram: hidroxihexadecadienoilcarnitina: C16:2-OH (93% correlação negativa com HPN), hexanoilcarnitina: C6 (71%), dodecenoilcarnitina: C12:1 (55%), decenoilcarnitina: C10:1 (54%), hidroxitetradecadienoilcarnitina: C14:2-OH (44%), tetradecenoilcarnitina: C14:1 (33%), tetradecadienoilcarnitina: C14:2 (32%). Os metabólitos do grupo aminoácidos reduzidos na HPN foram: aspartato (41% correlação negativa com HPN), glutamato (34%) e histidina (32%). E a amina biogênica reduzida nos pacientes com HPN foi a taurina (40%).

Os metabólitos do grupo fosfatidilcolinas reduzidos na HPN foram: PC com resíduo acil-alquil C 40:3 (40% correlação negativa com HPN), PC com resíduo diacil C 40:3 (34%), PC com resíduo acil-alquil C C38:3 (33%), PC com resíduo diacil C34:2 (33%) e PC com resíduo diacil C 36:3 (30%).

Tabela 10. Os vinte e cinco metabólitos com maior diferença estatística entre o grupo HPN e controle

Metabólito	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
C6:1	0.81	18.72	1.21E-44	1.04E-42
C16-OH	0.48	7.47	3.05E-12	8.80E-11
C18	0.44	6.70	2.38E-10	5.87E-09
C18:1	0.42	6.37	1.41E-09	2.71E-08
C16	0.41	6.07	7.05E-09	1.11E-07
C3-OH	0.38	5.56	9.48E-08	1.17E-06
C16:2	0.38	5.53	1.06E-07	1.23E-06
C16:1	0.37	5.38	2.18E-07	2.36E-06
C18:2	0.32	4.65	6.26E-06	4.71E-05
PC aa C36:3	-0.30	-4.34	2.31E-05	1.60E-04
Histidina	-0.32	-4.56	9.17E-06	6.61E-05
C14:2	-0.32	-4.68	5.42E-06	4.26E-05
PC aa C34:2	-0.33	-4.70	5.02E-06	4.13E-05
C14:1	-0.33	-4.80	3.18E-06	2.75E-05
PC ae C38:3	-0.33	-4.81	3.12E-06	2.75E-05
PC aa C40:3	-0.34	-4.86	2.52E-06	2.42E-05
Glutamato	-0.34	-4.95	1.65E-06	1.68E-05
PC ae C40:3	-0.40	-5.95	1.32E-08	1.76E-07
Taurina	-0.40	-6.00	1.01E-08	1.45E-07
Aspartato	-0.41	-6.16	4.49E-09	7.76E-08
C14:2-OH	-0.44	-6.60	4.09E-10	8.85E-09
C10:1	-0.54	-8.77	1.13E-15	3.90E-14
C12:1	-0.55	-8.90	4.91E-16	2.12E-14
C6	-0.71	-13.78	3.05E-30	1.76E-28
C16:2-OH	-0.93	-34.44	1.20E-82	2.08E-80

Na primeira coluna estão os grupos de metabólitos dispostos a partir da maior porcentagem e significância de correlação com HPN, separados em cores de acordo com sua correlação (linhas de cor laranja: metabólitos aumentados no grupo com HPN; linhas de cor azul: metabólitos reduzidos no grupo com HPN). Na segunda coluna, a correlação positiva com HPN foi demonstrada em valores decimais e não porcentagem; correlação negativa com HPN tem o sinal (-). Na terceira coluna, o valor de p (valor significativo considerado quando $p < 0,05$). Na quarta coluna, FDR (false discovery rate): porcentagem indicando os falsos positivos esperados entre todas as características previstas como significativas; exclui os falsos positivos aumentando a significância dos achados.

Tabela 11. Outros metabólitos de interesse com diferença estatística entre o grupo HPN e controle

Metabólito	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
Espermidina	0.42	5,41	2,69 E-07	3,35 E-6
Ornitina	0,25	2,98	0,0034	0,0106
Asparagina	0,17	2,04	0,0431	0,0824
lysoPC a C261	0,23	2,78	0,0062	0,0176
lysoPC a C260	0,17	2,01	0,0462	0,0874
C0	-0,31	-3,78	0,0002	0,0013
Valina	-0,28	-3,41	0,0008	0,0042
Glutamina	-0,27	-3,28	0,0013	0,0056
Arginina	-0,27	-3,24	0,0015	0,0055
Leucina	-0,22	-2,64	0,0092	0,0228
Serina	-0,20	-2,43	0,0163	0,0368
Metionina	-0,20	-2,37	0,0191	0,0400

A tabela 11 mostra outros metabólitos de interesse nos pacientes com HPN. Metabólitos aumentados (em laranja): aminoácidos espermidina, ornitina e asparagina; lisofosfatilcolinas. Metabólitos reduzidos: carnitina livre (C0) e os aminoácidos valina, glutamina, arginina, leucina, serina e metionina.

A Figura 11 mostra uma análise supervisionada utilizando-se o método Ortho-PLSDA. Os resultados mostram a separação completa entre os grupos controle (n=166) (vermelho) quando comparado ao grupo de pacientes com HPN (n=23) (verde) pré-eculizumabe (considerado amostras de pacientes que não iniciaram tratamento com eculizumabe e amostras coletadas imediatamente antes da administração do mesmo).

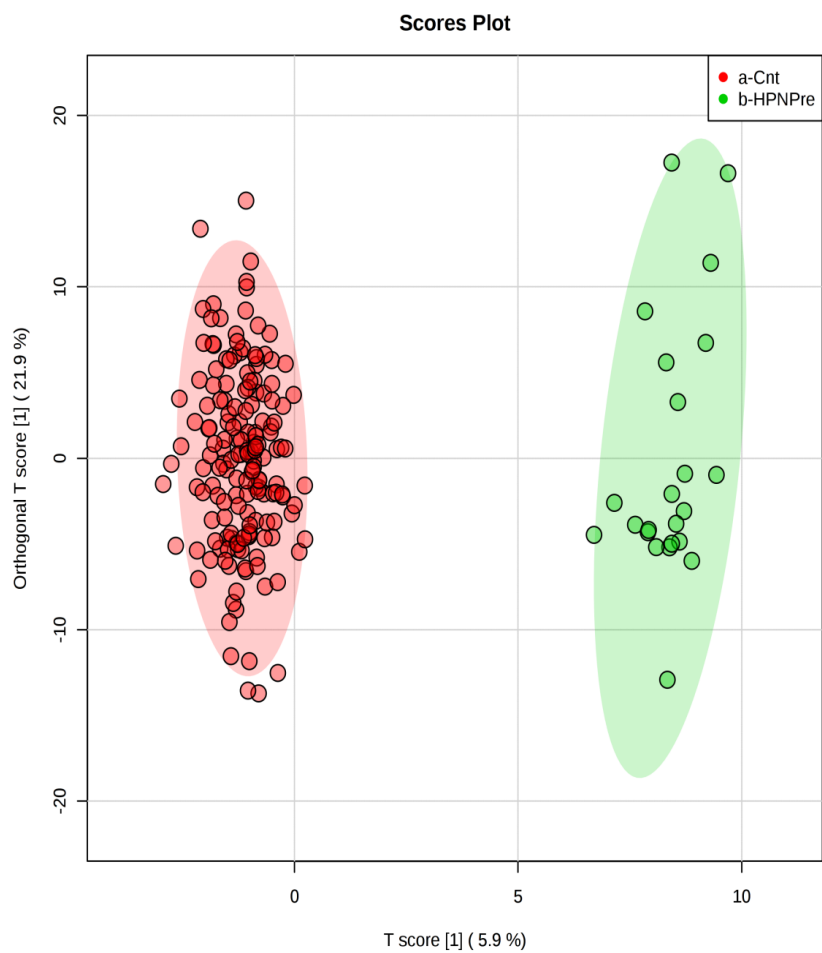


Figura 11. Análise pelo método Ortho-PLSDA. Grupos controle (n=166) (vermelho) e grupo de pacientes com HPN (n=23) (verde).

O Heatmap (Figura 12) foi realizado para identificar o padrão e a tendência da distribuição dos metabólitos encontrados de acordo com os grupos HPN (linha superior verde) e controle (linha superior vermelha).

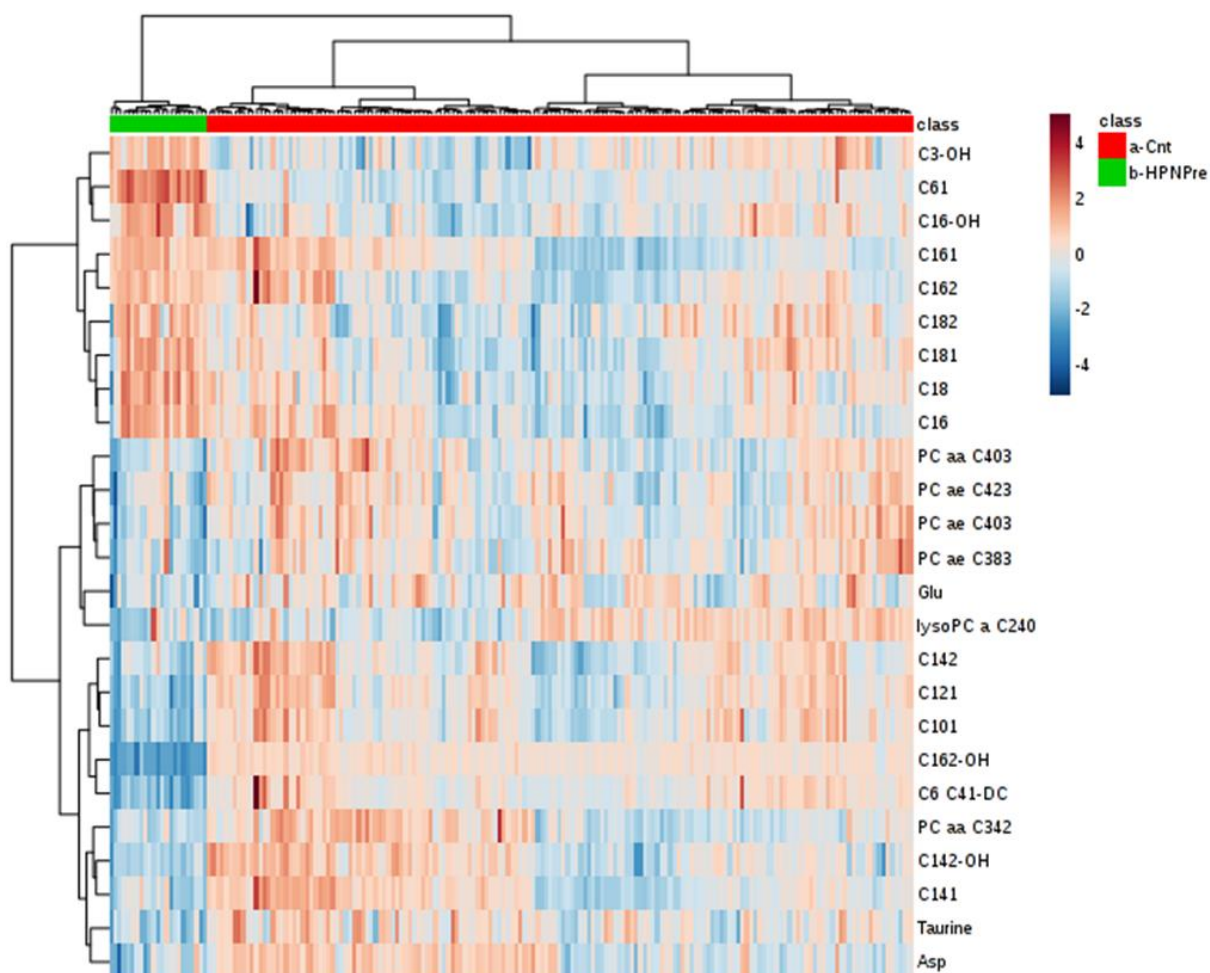


Figura 12. Análise multivariada, não-supervisionada utilizando-se Heatmap com os 25 metabólitos mais discriminadores entre HPN sem tratamento e pré administração de eculizumabe (n=23) e controles (n=166).

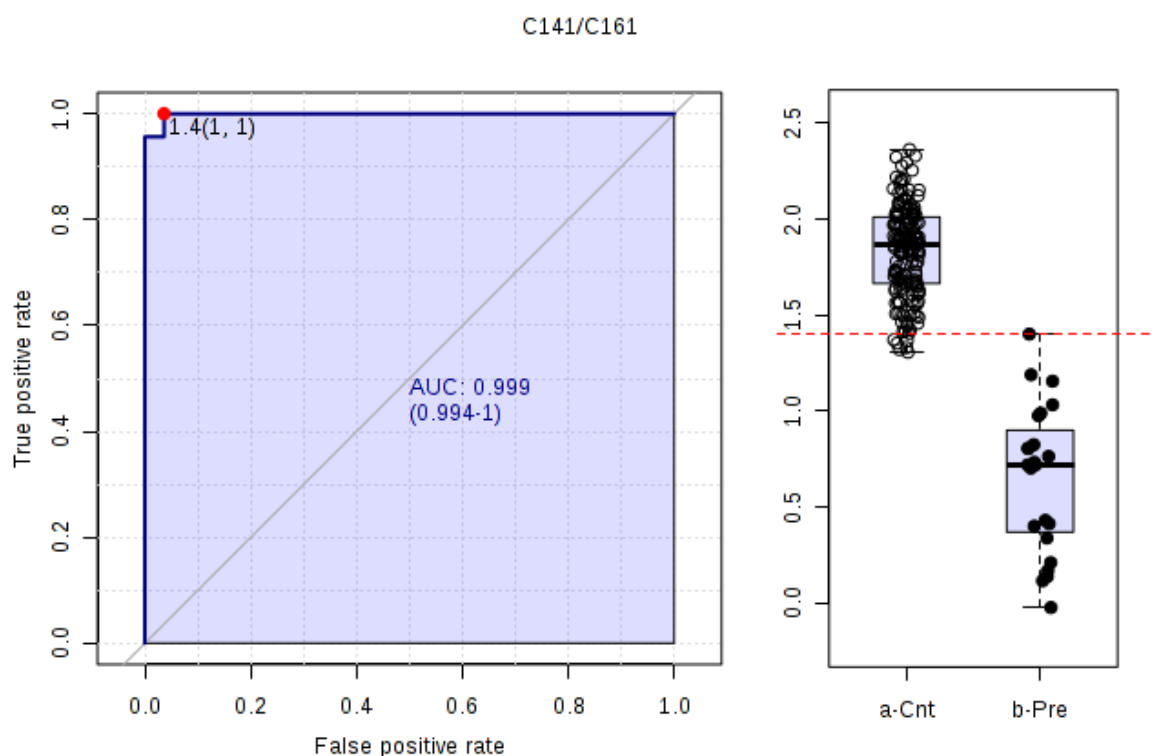


Figura 13. Curva ROC (*receiver operator characteristic*) da razão “C14:1/C16:1”, com indicações dos valores de corte baseados na área sob a curva (AUC), IC 95%: *cutoff* 1,4; sensibilidade 0,95 (0,87-1); especificidade 0,96 (0,93-0,99); *positive likelihood ratio* 27,66; *negative likelihood ratio* 0,0.

Foram testadas diversas combinações de pares de metabólitos encontrados nos pacientes com HPN hemolítica, mas a razão de acilcarnitinas C14:1/C16:1 (Tetradecenoilcarnitina/ Palmitoleilcarnitina), obteve a maior significância estatística, demonstrando sensibilidade de 95% e especificidade de 96% (curva ROC – figura 13) para valores encontrados desta razão menores que 1,4. O eixo y corresponde à fração dos verdadeiros positivos (equivalente à sensibilidade do método testado) e o eixo x corresponde à fração de falsos positivos (equivalente à especificidade do método). O ponto do gráfico no canto mais alto (superior esquerdo) é o ponto ideal do exame (sensibilidade e especificidade próximas a 100%).

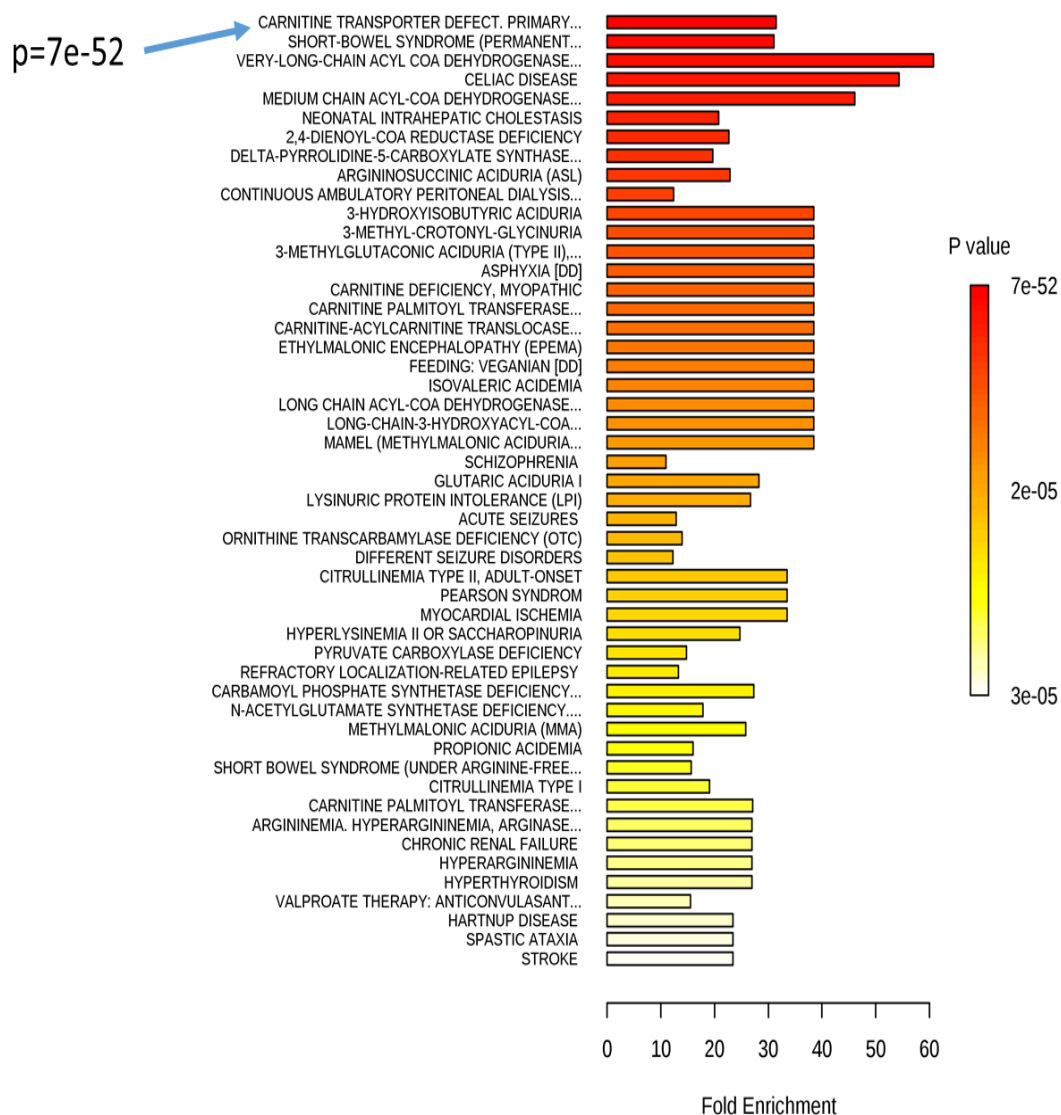


Figura 14. Análise não supervisionada comparando os resultados com aqueles depositados em bancos de metabolômica internacionais.

A Figura 14 mostra uma análise não supervisionada que compara os resultados dos pacientes com HPN hemolítica com aqueles depositados em bancos de metabolômica internacionais, apontando, que os resultados encontrados foram semelhantes aqueles observados em doenças metabólicas como deficiências de desidrogenase de colesterol aciltransferase (acil-CoA) de cadeia média, longa e muito longa e, principalmente Deficiências do Transporte de Carnitina Livre (Seta Azul).

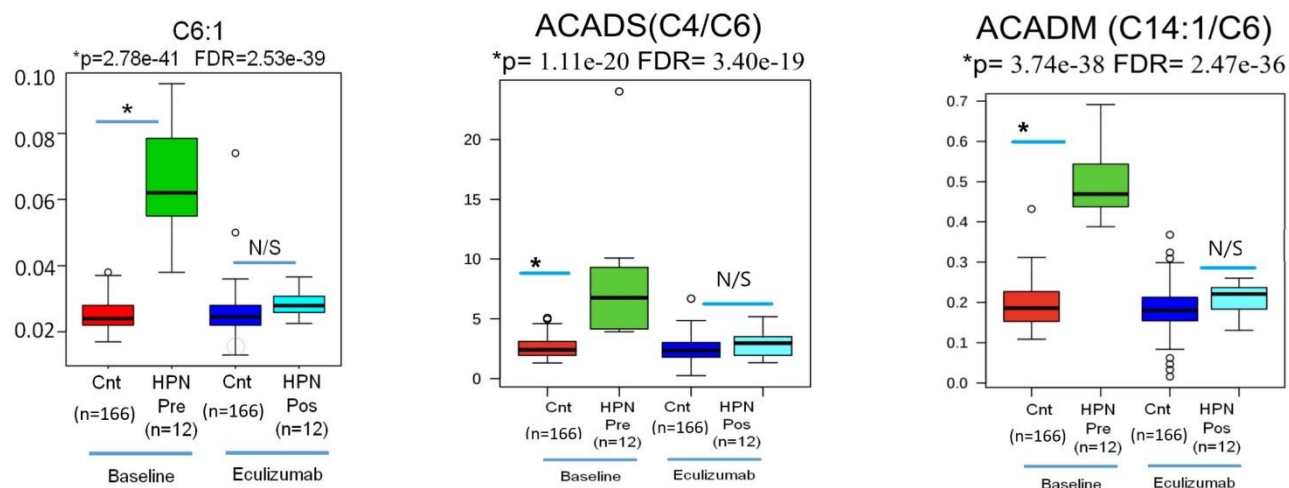


Figura 15. Concentrações da acilcarnitina C6:1, e as razões C14:1/6 e C4/C6 pré e pós dose de eculizumabe. N/S = Não Significante

A figura 15 demonstra os metabólitos validados quantificados nas amostras de doze pacientes que coletaram o sangue 24h após a dose de eculizumabe (HPN-Pós) e comparados com os mesmos pacientes previamente a este (HPN-Pré) (B). Os resultados demonstram que após a dose de eculizumabe, as concentrações da acilcarnitina C6:1; a razão C14:1/C6, refletindo a ação prejudicada das desidrogenases de acil-CoA de cadeia média (ACADM); e a razão C4/C6, refletindo a ação prejudicada das desidrogenases de acil-CoA de cadeia curta (ACADS), antes elevadas, foram reduzidas e alcançaram níveis similares aos controles.

5.0. Discussão

Reportamos nessa série de 109 pacientes com clone HPN as características clínicas dos pacientes separados em 3 grupos clínicos distintos, diagnosticados entre 1987 e 2018. A grande maioria dos pacientes teve diagnóstico antes dos 40 anos de idade, com uma discreta predominância masculina. Ao nosso conhecimento, ainda não existem séries de casos de pacientes brasileiros publicadas e o estudo atual é a maior série de casos descrita até o momento, além de ser a única série de pacientes em uso de eculizumabe descrita em nosso país até o momento.

Um dos estudos de caracterização clínica da HPN mais conhecidos é um estudo francês²⁷ que reuniu 460 pacientes com HPN de diversos centros entre 1950 e 2005. O maior banco de dados sobre a doença é o Registro internacional de Hemoglobinúria Paroxística Noturna, que inicialmente compilou informações de 1610 pacientes de 273 centros em 25 países³⁹, publicando posteriormente uma análise de mortalidade e fatores de risco em 2356 pacientes¹¹.

Os grupos 1 e 2, correspondentes a HPN hemolítica, apresentaram grande nível de morbidade, com sintomas proeminentes como fadiga e dor abdominal, além de anemia com necessidade de suporte transfusional, que interferiam significativamente na qualidade de vida destes pacientes, com prejuízo emocional e laboral. Os sintomas de fadiga, hemoglobinúria, dor abdominal e disfagia foram encontrados em porcentagens semelhantes aos estudos anteriores. Cefaleia foi um sintoma menos relatado em nosso grupo de pacientes³⁹.

As principais diferenças entre a nossa série e as demais séries da literatura internacional foram a baixa frequência de trombose venosa ou arterial em pacientes hemolíticos mesmo sem o uso de eculizumabe e a baixa frequência de doença renal crônica em nossa série, bem como a excelente sobrevida global observada nos pacientes com HPN clássica mesmo entre aqueles não tratados com eculizumabe.

Houve tromboembolismo venoso em 26% dos pacientes, sendo metade dos casos trombose venosa abdominal, com Budd-Chiari em quatro casos. Todos apresentaram a trombose antes do início de tratamento com eculizumabe, e dois destes pacientes tiveram mais de um evento mesmo em vigência de anticoagulação plena. Trinta e sete dos 56 pacientes (67%) receberam anticoagulação terapêutica (17 pacientes) ou profilática (20 pacientes), neste caso administrada em pacientes com HPN hemolítica previamente ao início de eculizumabe, se não houvesse

contraindicações ao uso de anticoagulantes como plaquetopenia moderada ou grave, sangramento ativo ou varizes de esôfago. O uso de anticoagulação profilática nestes pacientes pode explicar a menor incidência de trombose encontrada neste estudo em relação aos dados de literatura. Sabe-se que ao menos um evento trombótico pode ocorrer em até 29 – 44% dos pacientes com HPN durante o curso de sua doença. O tromboembolismo é a principal causa de morte relatada em HPN hemolítica, representando 40% até 67% das mortes nestes pacientes¹⁴. Em nosso estudo, de quatro óbitos que ocorreram nos grupos 1 e 2, dois (50%) foram devidos a complicações trombóticas (insuficiência hepática decorrente de Budd-Chiari e AVC isquêmico). Ambos os pacientes não chegaram a iniciar tratamento com eculizumabe ou receber anticoagulação profilática. Embora recomendada, a anticoagulação profilática ainda é tema de discussão pela falta de estudos randomizados sobre o assunto. Hall et al⁸⁵ compararam retrospectivamente a frequência de trombose em pacientes com tamanho de clone HPN em granulócitos maior que 50% que receberam ou não profilaxia primária com varfarina. A taxa de trombose em 10 anos foi de 36,5% em 56 pacientes sem profilaxia, enquanto que não foi relatado tromboembolismo em 30 pacientes que receberam varfarina, sendo este estudo a principal referência para aqueles que recomendam a profilaxia antitrombótica neste grupo de pacientes.

Dados do Centro Nacional Britânico de HPN, em Leeds, Reino Unido⁴², mostraram uma importante redução na taxa de trombose em doentes tratados com eculizumabe: a taxa foi de 5,6 eventos por 100 pacientes-ano previamente ao início do tratamento, e apenas 0,8 eventos por 100 pacientes-ano após o uso de eculizumabe ($P < 0,001$). O tratamento com eculizumabe em pacientes com HPN demonstrou resultar em diminuição das micropartículas do fator tecidual, geração de trombina, D-dímero, complexos trombina-antitrombina, complexos plasmina-antiplasmina, IL-6 e marcadores de ativação de células endoteliais^{86, 87}. Em nosso estudo, até este presente momento, nenhum paciente apresentou novo evento trombótico após o início de uso de eculizumabe, mesmo descontinuando a profilaxia primária após o início do tratamento. Em pacientes com antecedente de tromboembolismo prévio, foi mantida a anticoagulação.

Sabe-se que até 20% dos pacientes com HPN podem desenvolver doença renal de grau moderado a grave⁸⁸. Em um estudo que avaliou 195 pacientes com

HPN hemolítica, a incidência de insuficiência renal foi de 21%, com 25% destes apresentando taxa de filtração glomerular menor que 30ml/min e 7% apresentando história de insuficiência renal aguda com recuperação parcial de função renal. Vários mecanismos têm sido propostos para insuficiência renal em pacientes com HPN. As crises de hemólise intravascular liberam heme livre que causam toxicidade direta através da deposição nos túbulos renais, além de isquemia renal causada pela hipovolemia e resposta inflamatória aguda. A longo prazo, a hemólise crônica pode levar a insuficiência renal crônica pelo depósito de hemossiderina nos túbulos contorcidos, e episódios de trombose microvascular podem levar a isquemia do córtex renal⁸⁸. Em nosso trabalho, a incidência de disfunção renal foi menor comparada a literatura, com apenas 5 pacientes (10%) do grupo hemolítico apresentando insuficiência renal aguda e necessidade de terapia dialítica em decorrência de uma crise hemolítica, porém evoluindo com recuperação de função renal após resolvido o evento. Nenhum paciente nessa série apresentava doença renal crônica de grau moderado ou grave. O uso de eculizumabe em grande parte dos pacientes e consequente redução de hemólise intravascular pode ter relação com a menor incidência de disfunção renal encontrada, mas certamente não é a única explicação, considerando-se que a mediana de tempo entre o diagnóstico e o início do eculizumabe foi superior a 2 anos.

Muitos pacientes (40%) chegaram a receber corticoterapia com prednisona. Este número é elevado pelos casos que foram avaliados antes do advento do eculizumabe e porque muitos pacientes vieram encaminhados de outros serviços, já que o Hospital São Paulo é um serviço terciário e de referência, e em nosso serviço não usamos prednisona para HPN. Atualmente, sabe-se que embora a prednisona possa reduzir a frequência das crises hemolíticas em alguns pacientes, há pouco benefício do uso de corticoterapia⁸⁹ no tratamento do HPN, tendo em vista os inúmeros efeitos adversos relacionados ao uso de corticoide por tempo prolongado, incluindo síndrome de Cushing, osteoporose, diabetes secundária, hipertensão, ganho de peso, entre outros. Assim, atualmente não há recomendação de seu uso no tratamento da HPN.

A mediana de tempo do diagnóstico até o início de uso do eculizumabe foi de 25 meses (variando de 2 a 275 meses), sendo importante ressaltar que a demora em muitos casos para iniciar o tratamento foi devida a dificuldade de acesso para

conseguir a medicação. Houve uma significativa melhora na anemia, com hemoglobina ao diagnóstico com mediana de 9,1g/dL aumentando para 11,7 g/dL, e importante redução na hemólise intravascular, avaliada pela redução dos níveis de DHL ao diagnóstico (mediana de 4,17 vezes maior que o valor de referência) e após o uso do eculizumabe (mediana de 0,98 vezes o valor de referência).

Apesar da grande maioria dos pacientes tratados com eculizumabe obterem boa resposta, sabe-se que até 25 a 35% dos pacientes permanecem com anemia e necessidade transfusional⁹⁰. Em nosso estudo, a sobrevida livre de transfusão foi de 92%, com 94% dos pacientes adquirindo independência transfusional. Porém, 73% dos pacientes não obtiveram normalização nos níveis de Hb e 6% dos pacientes ainda apresentam necessidade transfusional. O motivo mais frequente atribuído a anemia persistente é a hemólise extravascular.

Após o uso de eculizumabe, 47% dos pacientes testados apresentaram positividade no TAD, sendo a positividade para C3 em todos os casos. Avaliando os pacientes TAD positivo, não houve diferença estatística de Hb, DHL e bilirrubinas quando comparado aos pacientes TAD negativo, entretanto notamos maior número de reticulócitos ($p=0,03$). As hemácias protegidas pelo eculizumabe são deficientes em CD55 e, portanto, suscetível à opsonização por C3, explicando porque boa parte (cerca de 50%) dos pacientes com HPN (TAD negativo ao diagnóstico), tornam-se TAD-positivo após o tratamento. Ainda assim, nossos dados confirmam que a positividade do TAD não parece se correlacionar com o grau da anemia ou com a intensidade da hemólise. Podemos imaginar que essa falta de correlação possa significar que pacientes TAD negativo também apresentam hemólise extravascular mediada pela fração terminal do complemento o que explica a persistência da anemia, ainda que leve, associada a reticulocitose na grande maioria dos pacientes tratados com inibidores de C5. Como não observamos qualquer correlação entre o grau de hemólise extravascular e a positividade do TAD e também porque não existe atualmente recomendação de qualquer intervenção terapêutica nesses pacientes TAD positivos, desde 2015 paramos de solicitar o TAD para os nossos pacientes tratados. Essa medida visa ainda desonerar o sistema de saúde com exames desnecessários.

Outros fatores que podem ser envolvidos em determinar a persistência da hemólise é o polimorfismo genético em diferentes reguladores do complemento,

como fator H, fator I, CR1⁹¹, e até mesmo a glicoforina, podem ser envolvidos no controle da hemólise residual. A quantidade de CR1 na superfície dos eritrócitos modulam a ligação de fragmentos C3 às hemácias GPI negativas quando o C5 é inibido. Pacientes com HPN com polimorfismos que levam a baixos níveis de CR1 (genótipo L / L) têm respostas piores ao eculizumabe do que pacientes com níveis de CR1 intermediários (genótipo H / L) ou altos (genótipo H / H)³⁶.

Recentemente, também foi descoberta uma mutação heterozigótica no C5 do tipo *missense*, c.2654G → A, que impede a ligação e bloqueio pelo eculizumabe. Este polimorfismo é responsável pela menor resposta ao eculizumabe em pacientes portadores desta mutação, presente em 3,5% dos japoneses e ainda não descrito em outros grupos étnicos⁹².

Em nossa série de casos, uma paciente em especial chamou nossa atenção, por manter anemia e hiperbilirrubinemia mesmo após o tratamento, chegando a 11mg/dL de bilirrubina indireta, apesar de ter obtido redução nos níveis de DHL. Realizamos pesquisa de síndrome de Gilbert que resultou negativa. Um estudo recente²⁸ sugeriu que a hiperbilirrubinemia em pacientes com HPN tratados com eculizumabe pode não ser devido a uma resposta insuficiente a medicação, mas sim uma combinação de fatores, entre eles mutações em receptores do transporte hepatocanalicular, síndrome de Gilbert, além da hemólise extravascular. Foram descritas mutações homozigóticas e heterozigotas nos genes dos receptores hepatocanaliculares ABCB4, ABCB11 e ATP8B1 em 8 de 8 pacientes estudados com hiperbilirrubinemia persistente após uso de eculizumabe²⁸. Não tivemos acesso a pesquisar essas mutações em nossa paciente.

A complicação mais temida relacionada ao uso do eculizumabe, a infecção meningocócica, não foi relatada em nenhum paciente em tratamento com eculizumabe em nossa série. Todos os pacientes receberam vacina meningocócica e a profilaxia com penicilina V oral ou penicilina benzatina, como recomendado pelos grupos francês e inglês⁹³, ⁴².

Fato interessante observado foi que quatro pacientes tiveram o uso de eculizumabe interrompido após um determinado período de uso: dois destes pacientes porque foram submetidos a TCPH alogênico, obtendo negativação do clone HPN, e os outros dois pacientes porque evoluíram com redução importante do tamanho do clone (para menos de 10%) e remissão dos sinais de hemólise 6 e 8

anos após o início de uso da medicação, respectivamente. Embora seja um evento raro, há descrito na literatura casos de remissão espontânea da HPN. Um estudo de Leeds que avaliou 79 pacientes consecutivos tratados com eculizumabe entre 2002 e 2010 descreveu remissão espontânea de HPN em um único paciente⁴². Um dos trabalhos mais recentes é um estudo finlandês⁹⁴ publicado em 2018 que avaliou 106 pacientes com clone HPN e observou remissão espontânea com desaparecimento do clone em 6 pacientes, quatro dos quais tinham HPN hemolítica, com mediana de tempo do diagnóstico até remissão de 12,5 meses. Todos os seis pacientes apresentavam aplasia de medula concomitante. Nenhum destes pacientes havia recebido eculizumabe e dois destes pacientes tiveram posteriormente diagnóstico de leucemia mieloide aguda. Outro centro espanhol que avaliou 56 pacientes, notou redução de tamanho do clone HPN em 17 pacientes, alcançando o desaparecimento completo em 6 pacientes (principalmente formas subclínicas) e mantendo-se detectáveis com tamanhos variáveis e sem hemólise ativa nos outros 11 pacientes. Quatro pacientes com HPN clássica tiveram essa evolução favorável, mas apenas um desses casos obteve desaparecimento completo do clone, após transplante alogênico¹³.

O grupo 3 apresentava sintomas relacionados a aplasia e não a hemólise, com manifestações hemorrágicas em 47% e complicações infecciosas em 36% dos pacientes estudados. Duas pacientes apresentaram evento tromboembólico, embora ambas apresentassem fatores de risco associado: trombose venosa profunda em mulher tomando anticoncepcional oral, e trombose de veia renal associada a pielonefrite. Entretanto, é importante lembrar que está descrito que mesmo pacientes com quantificação de clone abaixo de 10% têm maior incidência de trombose quando comparadas à população geral²².

O TCPH foi realizado em dois pacientes com HPN hemolítica da nossa série, sendo um do grupo 1 e um do grupo 2. O paciente do grupo 1 tinha o diagnóstico de HPN clássica com grande morbidade devido ao recorrente quadro de crises hemolíticas com necessidade transfusional e hospitalizações, por dificuldade no acesso ao tratamento com eculizumabe devido falhas no fornecimento da medicação. E o paciente do grupo 2 tinha HPN clássica inicialmente, mas evoluiu para anemia aplásica grave. Além disso, o TCPH foi realizado em cinco pacientes do grupo 3, HPN subclínica, todos com diagnóstico de anemia aplásica. O TCPH

alogênico continua sendo uma opção em casos com HPN associado a anemia aplásica e HPN hemolítica associada a aplasia ou naqueles com mau controle da hemólise, principalmente se associada a manifestações graves. Recentemente, houve avanços na técnica, que incluem estratégias para reduzir a doença do enxerto contra hospedeiro e o uso de condicionamento de intensidade reduzida, que mostrou-se eficaz e seguro na erradicação do clone HPN⁹⁵.

A sobrevida global foi menor no grupo 2, sendo de 71% em 5 anos. O grupo 1 teve sobrevida global de 100% em 5 anos e o grupo 3 de 89% em 5 anos. Esse dado é condizente com os estudos publicados, que mostraram maior mortalidade no grupo de HPN associada a aplasia¹¹. Dentre os óbitos, dois foram relacionados a complicações trombóticas que ocorreram antes de tratamento específico (falência hepática decorrente de Budd-Chiari e AVC isquêmico), um óbito relacionado a complicações infecciosas após TCPH alogênico, e os demais óbitos relacionados a neutropenia febril durante o tratamento de imunossupressão para anemia aplásica. A maior sobrevida no grupo 1, HPN clássico, provavelmente deve-se ao uso de eculizumabe, que mostrou melhorar o desfecho clínico neste grupo de pacientes através do seu efeito na redução de hemólise, incidência de trombose e complicações relacionadas, além da anticoagulação profilática e do adequado suporte clínico naqueles que não receberam o eculizumabe.

Em relação ao sequenciamento do gene PIG-A, encontramos no presente estudo 29 variantes do gene PIG-A em 27 de 31 pacientes estudados. Entre as mutações já descritas na literatura, encontramos dois pacientes com a mutação c.577_581delGTACT no éxon 2, configurando uma mutação *frameshift*, provavelmente patogênica, descrita em 2003 no trabalho de Mortazavi et al⁶⁰, e três pacientes com c.55C>T, mutação *missense* no éxon 2 com troca de arginina para triptofano, descrita previamente por Nafa et al⁵⁴, Endo et al⁵⁶ e Mortazavi et al⁶⁰ e também encontrada em estudo com indivíduos saudáveis⁶³. Em nossa classificação, esta mutação foi classificada como polimorfismo, com efeito benigno. Um paciente apresentava a mutação c.981+2T>C, localizado no íntron 4 sugerindo uma possível alteração no sítio de *splicing*, relatado no estudo de Yamada et al⁵⁷. Encontramos também uma mutação c.*7G>T relatada pelo *1000 Genomes* e dois polimorfismos

com incidência comum na população geral. As outras 23 mutações encontradas não têm relato prévio na literatura.

Desde que Miyata *et al*³ descobriram a relação entre a ausência de GPI em pacientes com HPN e a mutação do gene PIG-A, mais de 150 mutações^{96, 17, 60, 63, 55} foram descritas em pacientes de diversos países^{59, 57, 58}. O único trabalho publicado de pacientes brasileiros foi de Carvalho *et al*⁶⁵, que descreveu três pacientes com HPN clássica. Embora não publicado, um estudo maior foi feito em nosso Departamento e apresentado por Bidoia, BG *et al*⁶⁶, que encontraram mutações do PIG-A em dez pacientes com HPN, sendo a maioria delas mutações de ponto. Duas das mutações encontradas haviam sido descritas anteriormente, uma por Carvalho *et al*⁶⁵, G → A na porção 5' do íntron 2, e o polimorfismo c.55C>T, com troca de aminoácido arginina por triptofano, descrito previamente por Nafa *et al*⁵⁴, Endo *et al*⁵⁶ e Mortazavi *et al*⁶⁰ e encontrado também no presente estudo.

A maioria das mutações no PIG-A descritas são pontuais, composta por uma simples substituição de base, ou pequenas inserções ou deleções. Estas podem levar a mutações *nonsense*, criando um códon de parada imediata, mutações em *splice site*, afetando o *splicing* do mRNA, e mutações *missense*, caracterizadas por uma troca de nucleotídeo que leva a uma substituição de um aminoácido. Mutações em *frameshift* podem resultar em um códon de parada prematura e consequentemente em perda parcial ou total da função da proteína, devido alteração estrutural da mesma. Algumas mutações *missense* podem causar um dano parcial (podendo explicar o fenótipo HPN tipo 2, com deficiência parcial de proteínas ancoradas na GPI), enquanto outras causam total perda de função da proteína.

Nosso trabalho encontrou resultados semelhantes aos publicados previamente: as mutações mais observadas na literatura são as mutações em *frameshift*⁵⁴ e *missense*, observação constada em nosso estudo também, que contou com 42% de mutações *frameshift*, seguidas de 31% de mutações *missense*. Há o conceito de que para que uma mutação *missense* afete toda a função da proteína, ela deve ser localizada em um local crítico, e um estudo sugeriu que a maioria das mutações *missense* eram localizadas no éxon 2. Das nove mutações *missense* que encontramos, quatro eram localizadas no éxon 2, três no éxon 4 e duas no éxon 5, e de acordo com as escalas de predição de patogenicidade

utilizadas, a exceção de uma, c.55C>T, todas as outras eram provavelmente patogênicas.

Grandes deleções de parte do gene são raras de acontecer e pouco relatadas, sendo que Mortazavi *et al* relataram inserções de 30 a 80 pares de base e deleção acima de 10 pares de base em 4 pacientes⁶⁰. Em nosso estudo encontramos predominantemente mutações de ponto e pequenas deleções, e apenas uma deleção de maior tamanho: c.878_896delAGGATGTTAGAAATGTCTT no éxon 4, configurando uma mutação *frameshift* provavelmente patogênica.

As mutações do gene PIG-A descritas na literatura são encontradas aleatoriamente em toda a região codificadora. A maioria dos estudos não encontrou uma sequência genética onde as mutações ocorressem com maior frequência (*hotspot*), exceto por um que encontrou 15 casos de anemia aplásica e clone HPN com a mesma mutação (GTACT no c577-581 em éxon 2)⁶⁰. Esta mutação foi encontrada em dois pacientes com HPN clássica no nosso estudo, e as demais mutações que encontramos ocorreram através de toda a região codificadora. A localização mais frequente foi no éxon 2 (em 32% dos casos), provavelmente devido ao fato de ser o maior éxon do gene PIG-A, englobando quase metade de toda a região codificadora.

O mecanismo que determina a gravidade do HPN e a variedade de suas manifestações clínicas ainda não é conhecido. Não encontramos nenhuma correlação específica entre as características clínicas dos pacientes com HPN hemolítica e suas mutações, provavelmente devido à grande variedade de mutações. Na literatura, também não há nenhum estudo capaz de correlacionar os achados de mutação do PIG-A com as manifestações e o desfecho clínico dos pacientes, seja com a forma clássica da doença ou somente presença de clone em anemia aplásica. Somente um estudo coreano⁵⁸ encontrou dois pacientes com mutação apenas no éxon 3 e que apresentaram trombose venosa. Esse achado não foi confirmado, entretanto, no presente estudo e tampouco em outros trabalhos.

No presente estudo, pela avaliação dos programas de predição de patogenicidade, a maioria (22 de 29) das variantes encontradas foram classificadas como de impacto provavelmente patogênico nos pacientes com HPN. Dentre os 23 pacientes com HPN hemolítica, 19 pacientes apresentavam pelo menos uma mutação classificada como patogênica.

O paciente de número 9 chamou especial atenção pois trata-se de um paciente com HPN clássica, com grande clone HPN (>95%) e exuberantes manifestações clínicas relacionadas à hemólise e, apesar de apresentar 4 mutações, nenhuma aparentemente tinha um impacto patogênico. Outro caso intrigante é o do paciente de número 26, que também tinha diagnóstico de HPN clássica com manifestações de hemólise e grande clone ao diagnóstico, mas apresentou somente dois polimorfismos em nosso estudo. Entretanto, no momento de coleta, este paciente já estava em redução espontânea no tamanho do clone (33%) e posteriormente foi um dos pacientes que teve uso de eculizumabe interrompido por redução importante do clone HPN e remissão de hemólise. Talvez esta melhora espontânea possa estar ligada ao desaparecimento do clone com mutação patogênica que existia previamente.

Foram encontradas mutações concomitantes no gene PIG-A em dezenove pacientes com HPN hemolítica. Não foi encontrada uma diferença nas manifestações clínicas entre pacientes com mais de uma mutação e pacientes que apresentavam somente uma mutação. A presença de mutações concomitantes em um único paciente sugere que diversas linhagens de células tronco hematopoiéticas podem adquirir mutações do PIG-A distintas⁵⁴ e se diferenciarem em mais de um clone de células hematopoiéticas que crescem independentemente⁵⁶, dando suporte a hipótese de que a HPN é uma doença oligoclonal. Endo *et al* ⁵⁶ analisaram os clones de células T de uma paciente que possuía 4 fenótipos distintos baseadas na expressão de proteínas ancoradas ao GPI. Entre esses clones, foram identificadas quatro mutações diferentes do PIG-A, demonstrando que o mosaicismo genotípico é responsável pelo mosaicismo fenotípico característico da HPN. A presença de vários clones simultâneos diferentes com mutações distintas de PIG-A foi atribuída a um aumento na taxa de mutação, o que não foi confirmado até o momento⁹⁷. Clemente *et al* também demonstraram a presença de dois clones distintos, com mutações diferentes relacionados a células HPN II (fraca expressão de CD59) e a células HPN III (deficiência completa do CD59) de um mesmo paciente, separadas por *sorting*⁶².

Clones pequenos a moderados de HPN podem ser detectados em até 65% de pacientes com diagnóstico de anemia aplástica⁴³. Uma hipótese sugerida é que o ataque imune às células tronco hematopoiéticas encontradas nos pacientes com aplasia permite garantir uma vantagem de sobrevivência ao clone HPN⁹⁸, ⁹⁹. M

Okamoto *et al*⁶¹ notaram que pacientes com anemia aplásica e mielodisplasia apresentavam maior frequência de mutações em *missense*, enquanto pacientes com HPN clássica apresentavam predominantemente mutações em *frameshift*, sugerindo que as características das mutações do PIG-A eram diferentes nestes dois grupos.

Nos oito pacientes com HPN subclínica avaliados em nosso estudo, não foram observadas mutações de efeito patogênico, sendo encontrado nestes casos somente os polimorfismos de nucleotídeo único c.-116-13A>G e c.-116-311G>C, ambas com efeito real desconhecido e com grande incidência encontrada na população geral. Ambas são mutações encontradas na região 5', que não é transcrita. Considerando o fato de não ter sido usado um método de *sorting* para separar os leucócitos deficientes em GPI dos leucócitos normais, e pela observação de que os dois polimorfismos encontrados têm alta frequência na população geral, provavelmente eles não devem ter efeito patogênico.

Não foi possível detectar a mutação do gene PIG-A em quatro pacientes. Em dois destes, com HPN subclínica, o tamanho do clone HPN em granulócitos era muito pequeno, o que deve ter interferido na identificação da mutação do PIG-A pelo fato de não ter sido possível realizar *sorting* para separação somente das células GPI deficientes para análise. Os outros dois pacientes tinham diagnóstico de HPN hemolítica com tamanho de clone grande e para esses casos essa explicação não se aplica. Outra possibilidade é que as mutações nestes pacientes possam estar presentes em regiões que não foram estudadas, como regiões intrônicas, que não foram completamente analisadas neste estudo.

Outras hipóteses, como outras mutações do PIG, são menos prováveis devido a raridade destas condições. Há descrição de outras mutações do PIG envolvendo a síntese de GPI, como o PIG-M¹⁰⁰. Porém, trata-se de mutação rara, autossômica recessiva, sendo relatada em famílias consanguíneas, com quadro clínico envolvendo outras manifestações de maior gravidade, como retardo no desenvolvimento psicomotor, epilepsia e outras malformações. Apesar de haver relato de trombose na infância, incluindo síndrome de Budd-Chiari, não é comum o quadro de hemólise¹⁰⁰.

Foi relatada uma série de 4 casos de pacientes de família consanguínea¹⁰¹ que apresentavam mutação homozigótica em missense do PIG-T. Estes pacientes apresentavam múltiplas anormalidades esqueléticas, oftalmológicas,

endocrinológicas, além de um fenótipo facial típico e déficit intelectual. Há também descrição de uma paciente sem alterações neurológicas, porém com HPN clássica e que não demonstrava mutação no gene PIG-A, porém apresentava mutação heterozigótica no PIG-T em *splicing* ¹⁰². Acredita-se que a sua mutação heterozigótica possa ter evitado manifestações neurológicas e outras malformações. Entretanto, por se tratar de uma mutação em *splicing*, levou a perda total de função da proteína e foi suficiente para interferir na produção de GPI. Já na série de 4 pacientes consanguíneos anteriormente descrita, a família apresentava mutação do PIG-T homozigótica com inúmeras malformações, mas não apresentavam hemólise provavelmente porque a mutação era em *missense* e não foi suficiente para levar a perda completa da produção de GPI.

Estas outras mutações do PIG são consideradas eventos muito raros, já que estes genes são localizados em cromossomos autossômicos, sendo necessário as mutações em ambos os alelos para causar a deficiência no GPI ¹⁰³.

As alterações somáticas do gene PIG-A são relativamente comuns na hematopoese normal e podem ser encontradas em baixas frequências em adultos saudáveis ^{64, 104, 63}, que não necessariamente têm maior chance de desenvolver HPN. Assim, nem toda mutação encontrada pode ser unicamente responsável pelo desenvolvimento da doença.

É sugerido que somente a mutação isolada do PIG-A não seja suficiente para expansão clonal¹⁰⁵. Recentemente, alguns estudos^{106, 107} descreveram outras mutações envolvidas como TET2, MAGEC1, BRPF1, KDM3B, STAC3, SUZ12, U2AF1 e JAK2 em pacientes com HPN. Foi realizado o sequenciamento de células da medula óssea HPN positivas ou negativas demonstrando que tais mutações surgiram como um subclone dentro da população mutante PIG-A ou como evento inicial antes da própria mutação PIG-A. Assim, uma evolução clonal escalonada foi identificada, demonstrando uma hierarquia clonal complexa. Estes pacientes mostraram uma maior proporção de células com deficiência do GPI em relação a outros que não possuíam mutação adicional, sugerindo que outros eventos devem influenciar a expansão do clone HPN⁹⁷. Outro estudo investigou pacientes com HPN sem anormalidades cromossômicas¹⁰⁸ e mostrou que a expressão de HMGA2 foi significativamente alta em células do sangue periférico de 18 de 24 pacientes com HPN. O HMGA2 é um fator de transcrição arquitetural fisiologicamente expresso em

tecidos embrionários. A expressão ectópica de HMGA2 em adipócitos e células musculares lisas uterinas pode causar lipomas e leiomiomas, respectivamente. Um experimento mostrou que camundongos transgênicos expressando HMGA2 apresentaram fenótipos semelhantes aos observados em pacientes com neoplasias mieloproliferativas¹⁰⁹. Esses resultados dão suporte a ideia de que a expressão desregulada de HMGA2 pode contribuir para a expansão de células HPN.

Para melhor entendimento de outros mecanismos envolvidos na patogênese e na heterogeneidade de manifestações do HPN seria necessária a investigação de um número bem maior de pacientes e a análise de outras regiões e outros tipos de mutação possivelmente relacionadas a esta doença.

No presente estudo analisamos também um extenso painel de metabólitos no plasma de pacientes com HPN, por meio de espectrometria de massa em tandem de ionização por electrospray. Os resultados indicaram que pacientes com HPN hemolítica demonstraram um perfil distinto envolvendo o metabolismo de aminoácidos, bem como a β -oxidação de ácidos graxos em relação a indivíduos saudáveis. As acilcarnitinas, principalmente as de cadeia longa, foram os principais metabólitos aumentados nos pacientes com HPN, enquanto os principais metabólitos reduzidos incluíram fosfatidilcolinas e diversos aminoácidos.

Em nosso estudo, notamos um aumento importante na concentração plasmáticas de acilcarnitinas de cadeia longa bem como redução considerável de carnitina livre. Distúrbios da concentração relativa de carnitinas endógenas estão associados com distúrbios do metabolismo mitocondrial responsáveis pela geração de energia através dos ácidos graxos (figura 4, página 43). Danos em enzimas fundamentais no metabolismo de ácidos graxos, como deficiências nas desidrogenases de acil-CoA de cadeia curta, média e longa (ACADS, ACADM e ACADL) podem levar à diminuição de sua combustão completa, aumentando metabólitos intermediários de lipídios, como as acilcarnitinas.

As doenças da oxidação de ácidos graxos compreendem mais de 20 erros inatos do metabolismo autossômicos e o acúmulo de acilcarnitinas tem sido utilizado como marcador diagnóstico deste grupo de doenças congênitas. Manifestações clínicas dos erros de oxidação de ácidos graxos são de natureza episódica e aparecem nas condições catabólicas de aumento da lipólise¹¹⁰. Um estudo francês

que analisou 187 crianças com erros na β -oxidação de ácidos graxos, principalmente por deficiências de ACADM e ACADL, descreveu como manifestações clínicas predominantes alterações hepáticas (hepatomegalia, aumento de transaminases, esteatose, insuficiência hepática), alterações neurológicas (neuropatia periférica), musculares (dor muscular, miólise) e cardíacas (insuficiência cardíaca e arritmias)¹¹¹.

Outras condições além dos distúrbios herdados de oxidação de ácidos graxos, como isquemia cardíaca ou diabetes mellitus tipo 2¹¹⁰ são caracterizadas por níveis muito elevados (isquemia) ou discretamente aumentados (diabetes mellitus tipo 2) de acilcarnitinas de cadeia longa, sendo assim descrita sua relação com doença coronariana, sensibilidade à insulina e inflamação.

Em um estudo que avaliou 280 pacientes com hipertensão pulmonar por meio do cateterismo cardíaco¹¹², níveis circulantes mais altos de acilcarnitinas de cadeia longa foram encontrados nos pacientes com hipertensão pulmonar, em comparação com os controles sem a doença, mesmo após ajuste de diversas variáveis clínicas como idade, presença de diabetes, doença coronariana e fração de ejeção. Os níveis aumentados de acilcarnitinas de cadeia longa é um achado também descrito em pacientes com insuficiência ventricular esquerda, incluindo insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada e insuficiência cardíaca direita¹¹³. Isso sugere que anormalidades na cadeia longa acilcarnitinas refletem uma assinatura comum associada a uma disfunção mitocondrial do miocárdio.

Por outro lado, o aumento de acilcarnitinas na HPN também pode ter relação com o alto turnover de membrana celular de eritrócitos. Os glóbulos vermelhos demonstraram ter diferentes composições de carnitina em relação ao plasma, com acilcarnitinas compreendendo até 52% da carnitina total de eritrócitos em comparação com apenas 13% no plasma⁷⁰. Assim, a hemólise pode liberar mais acilcarnitinas dos eritrócitos para o plasma. As acilcarnitinas de cadeia longa também são capazes de romper barreiras de membrana e produzir solubilização completa da membrana⁷⁰. Cho & Proulx demonstraram lise de eritrócitos de ratos e humanos *in vitro*, observada após 15 minutos de incubação em um meio de ésteres de ácidos graxos sintéticos de DL-carnitina e colina. Estearoil carnitina foi a mais eficaz, enquanto l-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina e palmitoil carnitina foram mais potentes do que os ésteres acílicos de cadeia curta de carnitina ou qualquer éster na

série de ésteres de colina testados. Mesmo com concentrações mais baixas de qualquer lisina testada, a taxa de hemólise foi muito alta. Este achado levanta a hipótese de que acilcarnitinas de cadeias longas interagem com ligações hidrofóbicas que se formam entre lipídios e proteínas na membrana celular de eritrócitos¹¹⁴. Outros trabalhos que corroboram a relação de acilcarnitinas com hemólise incluem o de Gomes et al⁸³, tese também desenvolvida no Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP, que mostraram aumento de algumas acilcarnitinas de cadeias longas e médias em plasma de pacientes com anemia hemolítica autoimune, e Papassoutirou et al⁷⁹, que correlacionaram positivamente o nível de acilcarnitinas plasmático com reticulocitose em doentes falciformes. Darghout et al⁷⁷ também relataram aumento de acetilcarnitinas em hemácias de pacientes falciformes. Por outro lado, Kumar et al⁸¹ encontraram redução de carnitina livre, aumento de acilcarnitinas de cadeia média e redução de acilcarnitinas de cadeia longa e curta em pacientes com β -talassemia, sugerindo que há menor atividade de CPT1 nestes pacientes, porém com manutenção da atividade peroxissomal na produção de acilcarnitinas de cadeia média.

A razão C14:1/C16:1 mostrou-se um biomarcador confiável em pacientes com HPN quando encontrado valores menores que 1,4, sugerindo que o alongamento de lipídeos está facilitado, podendo este ser ligado ao aumento da atividade da desaturase 9. Foram testadas diversas combinações de pares de metabólitos encontrados nos pacientes com HPN hemolítica, mas a razão de acilcarnitinas C14:1/C16:1 (Tetradecenoilcarnitina/ Palmitoleilcarnitina), obteve forte significância estatística, demonstrando sensibilidade de 95% e especificidade de 96% (curva ROC- figura 13). Quando avaliamos pacientes imediatamente antes de receber eculizumabe e 24 horas após a administração do medicamento, notamos uma tendência a normalização na dosagem de C6:1 e nas razões C14:1/C6, sugestiva de atividade prejudicada de ACADM e C4/C6, sugestiva de atividade prejudicada de ACADS, que encontravam-se bastante elevadas nos pacientes pré administração do medicamento, indicando que provavelmente o tratamento com eculizumabe interfere no perfil metabólico de acilcarnitinas dos pacientes, tendendo a aproximá-los do normal. Nas amostras de HPN é provável que estes achados estejam aumentados devido ao aumento do turnover da membrana de hemácias. O tratamento com eculizumabe reduz a hemólise e consequentemente o estresse oxidativo e a

inflamação, portanto, trazendo as concentrações de acilcarnitinas próximas aos níveis normais.

A redução na carnitina livre e o aumento das concentrações totais de acilcarnitinas de cadeia média e longa de pacientes com HPN indicam que nesta população, o equilíbrio entre diferentes acilcarnitinas está prejudicado, podendo contribuir para sintomas relacionados a fraqueza muscular, hipertensão pulmonar e eventos cardiovasculares. Este padrão encontrado assemelha-se a eventos bioquímicos descritos em erros inatos sistêmicos do metabolismo, particularmente, as disfunções de β -oxidação mitocondrial e / ou peroxissomo. Os resultados encontrados foram semelhantes aqueles observados nas deficiências de desigrogenases de acil-CoA de cadeia média e longa e deficiências do transporte de carnitina livre. O aumento de acilcarnitinas em pacientes com HPN no nosso estudo também pode ilustrar a sua interação com a membrana de eritrócitos favorecendo a hemólise. Assim, uma melhor compreensão do equilíbrio alterado das acilcarnitinas nos pacientes com HPN requer mais estudos.

Encontramos em nosso trabalho algumas fosfatidilcolinas reduzidas e algumas lisofosfatidilcolinas aumentadas nos pacientes com HPN, indicando que estes pacientes também possuem um distúrbio na metabolização dos glicerofosfolípidios. Tal achado pode ter relação com a metabolização prejudicada de ácidos graxos e colaborar para a disfunção endotelial vista nestes pacientes. Além disso, as fosfatidilcolinas servem como reservatório de ácidos graxos (por exemplo, ácido araquidônico) que são precursores de moléculas sinalizadoras derivadas de lipídios. A hidrólise de uma molécula de fosfatidilcolina resulta na produção de lisofosfatidilcolina, que é um lipídio bioativo envolvido no recrutamento de monócitos, proliferação de células do músculo liso vascular e disfunção endotelial¹¹⁵.

Um grande estudo populacional em que usou-se espectrometria de massa por ionização com electrospray para avaliar o perfil lipidômico em amostras de sangue de 3316 indivíduos, foi demonstrado que fosfatidilcolinas de cadeia longa de ácidos graxos polinsaturados têm um efeito protetor cardiovascular e na redução de mortalidade, em especial : PC 38:5, PC 38:6, PC 36:5¹¹⁶. Em um estudo menor, que avaliou 85 pacientes com diagnóstico de doença arterial periférica e doença

coronariana, níveis séricos reduzidos de várias fosfatidilcolinas (por exemplo, PC aa C28: 1, PC aa C30: 0, PC45 aa C32: 2, PC ae C30: 0, PC ae C34: 2,) foram observados no grupo de pacientes em relação a controles saudáveis¹¹⁵.

Nos pacientes com HPN, o achado de baixos níveis de glutamato, glutamina, alanina e aspartato podem indicar que a glutaminólise está prejudicada nesta condição clínica. As concentrações reduzidas desses aminoácidos podem estar também ligadas a atividade dos sistemas de transporte de glutamato e glutamina do plasma. Em pacientes com anemia falciforme, foi relatado aumento nas concentrações de glutamato, glutamina, glicina e alanina em preparado de hemácias falciformes, sugerindo aumento de glicina no plasma e aumento na atividade dos sistemas de transporte de glutamina e glutamato do plasma para a hemácia⁷⁷.

Em paralelo, também encontramos em nosso estudo diminuição da concentração plasmática de diversos aminoácidos além do glutamato e da glutamina, tais como arginina, histidina, metionina, valina, serina, alanina e aspartato. Todos esses aminoácidos podem se transformar em piruvato ou em um intermediário do ciclo de Krebs (figura 6, página 45) a fim de gerar glicose, sugerindo que pode haver prejuízo na glicogênese destes pacientes. Somente um aminoácido desta via glicogênica encontrava-se aumentado, a asparagina. Por outro lado, os aminoácidos envolvidos na via cetogênica não foram afetados de modo estatisticamente significativo.

A arginase converte a arginina em ornitina, que junto com seus metabólitos são substratos para proliferação celular, síntese de colágeno e regeneração tecidual. A arginina também é substrato na síntese de óxido nítrico e espécies reativas de nitrogênio. A conversão de arginina em ornitina e ureia pela arginase ocorre principalmente no fígado, mas a arginase também está presente em hemácias¹¹⁷. O óxido nítrico tem ação vasodilatadora e sua deficiência na HPN está ligada a hemólise, onde a hemoglobina livre consome NO, enquanto a arginase eritrocitária consome rapidamente o substrato obrigatório para a produção de NO.

Em nosso estudo, encontramos arginina reduzida e ornitina aumentada em pacientes com HPN, sugerindo aumento da atividade de arginase, assim como visto em pacientes falciformes como consequência da inflamação, disfunção hepática e principalmente pela liberação de arginase eritrocitária durante a hemólise. A

deficiência de arginina nos pacientes falciformes está associada a níveis elevados de arginase e uma baixa razão arginina-ornitina que correlaciona-se com marcadores de hemólise¹¹⁸.

A degradação de arginina pela arginase eritrocitária gera ornitina, um metabólito que é o precursor da síntese de poliaminas e quando degradado, gera putrescina e, posteriormente, espermina e espermidina. Aumento nas concentrações de espermidina foram encontradas em pacientes com HPN comparados com controles, indicando um maior catabolismo da ornitina (figura 8, página 49), conforme visto também em pacientes com anemia falciforme¹¹⁷ e anemia hemolítica autoimune⁸³.

Outros aminoácidos de interesse alterados foram taurina e histidina, encontrados diminuídos em pacientes com HPN. A taurina tem uma variedade de funções fisiológicas nas células, incluindo a regulação de osmolaridade intracelular, manutenção da homeostase do cálcio iônico, estabilização de membrana, neuromodulação, atenuação do estresse oxidativo. A depleção de taurina causa vários defeitos, como deficiência visual, metabolismo energético prejudicado e alterações na musculatura¹¹⁹.

Os altos níveis de taurina em macrófagos, leucócitos e em tecidos expostos a níveis altos de oxidantes sugerem seu papel na imunidade celular. O estresse oxidativo é um dos principais fatores responsáveis pelo dano tecidual em condições inflamatórias como infecção, câncer e envelhecimento. Em um local de inflamação, o estresse oxidativo é mediado por espécies reativas de oxigênio geradas principalmente neutrófilos, macrófagos, eosinófilos ativados. Sugere-se que a taurina pode desempenhar um papel antiinflamatório associado ao estresse oxidativo, através da redução da apoptose e ação antioxidante. A taurina reage com o ácido hipocloroso gerado pelo sistema de halogenato de mieloperoxidase do neutrófilo (MPO), e é convertida em cloramina de taurina, neutralizando a ação tóxica do ácido hipocloroso. Além disso serve como um modulador do sistema imunológico também por interferir com a produção de vários mediadores pró-inflamatórios e ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B)¹²⁰.

Zhang et al relataram que a proliferação de células musculares lisas vasculares em ratos foi inibida pelo tratamento com taurina. Há estudos que sugerem uma relação entre a diminuição da taurina no soro e na progressão de

aterosclerose e doença vascular coronariana, e que sua presença é fator de proteção de insuficiência cardíaca e isquemia coronariana^{121, 122}. Assim, o baixo nível de taurina encontrado em pacientes com HPN parece ser mais um fator que os deixam mais suscetíveis ao estresse oxidativo.

A histidina é um aminoácido aromático devido à sua cadeia lateral que contém um grupo imidazol, que serve de ligante para átomos metálicos, como a hemoglobina. As ligações covalentes entre a heme e a globina ocorrem entre as histidinas da globina e o radical propil do pirrol. O ferro liga-se a globina através da histidina proximal e as histidinas distais são cruciais para regular tanto as afinidades quanto as taxas de ligação de O₂ à hemoglobina humana adulta, além de desempenhar um papel-chave na discriminação entre ligação de O₂ e CO¹²³.

Em nosso estudo, observamos que as concentrações plasmáticas de histidina estavam bastante reduzidas no grupo de pacientes com HPN. Esse achado é presente em vários distúrbios inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide, doença renal crônica e doença inflamatória intestinal¹²⁴. Em estudo in vitro, foi mostrado que a histidina reduz o estresse oxidativo inibindo a secreção de IL-8 induzida por peróxido de hidrogênio e TNF- α no nível da transcrição em células epiteliais intestinais¹²⁵. Além disso, a suplementação de histidina poderia reduzir a IL-6 e o TNF- em um modelo de camundongo diabético. Em um estudo que avaliou 325 pacientes com doença renal crônica, as concentrações plasmáticas de histidina foram significativamente menores em pacientes com história concomitante de doença cardiovascular, desnutridos e inflamados. A histidina plasmática foi associada negativamente com a idade, proteína C-reativa, IL-6, leucócitos, fibrinogênio, fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento semelhante à insulina-1, e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina. Após ajuste para idade, sexo, doença cardiovascular, inflamação, diabetes mellitus e suplementação de aminoácidos, a associação entre baixa histidina e mortalidade permaneceu significativa (razão de risco: 1,55; IC 95%: 1,02, 2,40; P 0,05)¹²⁶.

Uma baixa concentração plasmática de histidina também foi associada com doença cardiovascular, insuficiência cardíaca e a presença de placas carotídeas, condições também relacionadas com inflamação e estresse oxidativo¹²⁷. Além disso, há estudos mostrando que a glicoproteína rica em histidina, uma molécula encontrada em humanos e outros mamíferos, são acentuadamente reduzidos

durante a fase inespecífica de resposta à lesão tecidual. A glicoproteína rica em histidina pode interagir com diferentes receptores da superfície celular, e tem sido implicada na regulação de numerosas funções biológicas, notadamente a angiogênese, depuração de complexos imunes e coagulação¹²⁸. A glicoproteína rica em histidina atenua a ativação dos fatores XII e XI, demonstrando que modula a via de contato e pode servir como regulador endógeno de trombose atenuando a atividade pró-coagulante¹²⁹.

Em conclusão, a hemólise crônica, o estado pró inflamatório e o estresse oxidativo vistos nos pacientes com HPN podem estar associados aos achados metabólicos encontrados neste estudo. As baixas concentrações de fosfatidilcolina e aminoácidos como taurina e histidina, tendo em vista sua atividade antioxidante, podem aumentar o estresse oxidativo e facilitar eventos vasculares, sendo um fator de risco adicional a este grupo de pacientes. Importante citar que em pacientes com HPN, os eventos vasculares constam como uma das principais causas de óbito. Em um registro de 2356 pacientes com HPN, os eventos vasculares foram a terceira maior causa de mortalidade, responsável por 11% dos óbitos¹¹.

O perfil encontrado de alguns metabólitos assemelha-se a outras doenças que tem como manifestação principal a hemólise, tais como baixa concentração de arginina, que serve como substrato na via de biossíntese de óxido nítrico, aumento de poliaminas decorrente do consequente aumento de ornitina, distúrbios na homeostase de carnitina e acilcarnitinas, com consumo de carnitina livre e aumento de acilcarnitinas de cadeia longa. Estes achados estão presentes em doença falciforme e anemia hemolítica autoimune. Entretanto, outros resultados encontrados nos pacientes com HPN, como os demais aminoácidos diminuídos, entre estes aqueles que participam da via da glicogênese, além de glutaminólise prejudicada, não foram relatados em outras doenças hemolíticas e nem em anemia aplásica e sugere um perfil metabolômico distinto neste grupo de pacientes.

6.0. Conclusões

6.0. Conclusões

- As manifestações clínicas dos pacientes com HPN clássica, HPN associada a outra doença hematológica ou HPN subclínica nessa série de 109 pacientes foram em geral semelhantes àquelas descritas na literatura. Entretanto, as principais diferenças observadas foram: a baixa frequência de trombose venosa ou arterial em pacientes hemolíticos após adotadas medidas preventivas ou iniciado o uso de eculizumabe; e baixa frequência de doença renal crônica. Além disso, observamos excelente sobrevida global observada nos pacientes com HPN clássica após adotadas medidas preventivas, mesmo entre aqueles não tratados com eculizumabe.
- Houve grande variação no tipo e no local das mutações somáticas nos pacientes estudados. As mutações foram predominantemente de pequenas deleções e simples trocas de bases. Não houve qualquer correlação entre as mutações encontradas e as manifestações clínicas dos pacientes com HPN hemolítica. Em pacientes com HPN subclínica, foram encontrados somente SNPs.
- Os principais metabólitos aumentados em pacientes com HPN foram acilcarnitinas de cadeia longa, enquanto os principais metabólitos reduzidos em pacientes com HPN foram fosfatidilcolinas, histidina, glutamato, taurina e aspartato, sugerindo perfil distinto de metabólitos quando comparados aos controles saudáveis. Os valores $< 1,4$ gerados a partir da razão de C14:1/C16:1 mostraram-se de alto valor preditivo positivo na identificação de pacientes com HPN, sugerindo deficiências no processo de alongação dos lipídeos.
- Quando avaliamos pacientes imediatamente antes de receber eculizumabe e 24 horas após a administração do medicamento, notamos uma tendência a normalização na dosagem de C6:1 e nas razões C14:1/C6 e C4/C6, aproximando-se a dos controles saudáveis, demonstrando que o uso do anticorpo tem ação na redução de hemólise e possivelmente na função mitocondrial destes pacientes.

7.0. Referências

1. Parker, C. J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 93–103 (2008).
2. Parker, C. J. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'Defining the disease'. *Br. J. Haematol.* **117**, 3–22 (2002).
3. Miyata, T. *et al.* The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* **259**, 1318–20 (1993).
4. Takeda, J. *et al.* Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* **73**, 703–711 (1993).
5. Iida, Y. *et al.* Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **83**, 3126–31 (1994).
6. Wong, E. K. S. & Kavanagh, D. Diseases of complement dysregulation—an overview. *Semin. Immunopathol.* **40**, 49–64 (2018).
7. Hill, A., Dezern, A. E., Kinoshita, T. & Brodsky, R. A. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–14 (2017).
8. Borowitz, M. J. *et al.* Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **78**, 211–30 (2010).
9. Curran, K. J. *et al.* Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in Pediatric Patients. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 525–529 (2011).
10. Mercuri, A. *et al.* A retrospective study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adolescent patients. *Blood Cells, Mol. Dis.* **64**, 45–50 (2017).
11. Schrezenmeier, H. *et al.* Changing prognosis in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria disease subcategories; an analysis of International PNH Registry. *Intern. Med. J.* **46**, 1044–1053 (2016).
12. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, D. J. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1253–1258 (1995).
13. Muñoz-Linares, C. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single Spanish center's experience over the last 40 yr. *Eur. J. Haematol.* 1–11 (2014). doi:10.1111/ejh.12346
14. Hill A Hillmen P., K. R. J. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **121**, 4985–96 (2013).
15. Yu, F., Du, Y. & Han, B. A comparative analysis of clinical characteristics of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria between Asia and Europe/America. *Int. J. Hematol.* **103**, 649–654 (2016).
16. Brodsky, R. a. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **113**, 6522–6527 (2009).
17. Bessler, M., Mason, P. J., Hillmen, P. & Luzzatto, L. Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **87**, 863–866 (1994).
18. Hill, A., Richards, S. J. & Hillmen, P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **137**, 181–192 (2007).
19. Rosse, W. F. Clinical Manifestations of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria :Present State and Future Problems. *Int. J. Hematol.* **0275**, 113–120 (2002).
20. Rother, R. P., Bell, L. & Hillmen, P. The Clinical Sequelae of Intravascular

- Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA* **293**, 1653–1662 (2015).
21. Hillmen, P., Lewis, S. M., Bessler, M., Luzzatto, L. & Dacie, J. V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* **333**, 1253–8. (1995).
 22. van Bijnen, S. T. A., van Heerde, W. L. & Muus, P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1–10 (2012).
 23. Simak, J. *et al.* Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **125**, 804–13 (2004).
 24. Griffin, M. & Munir, T. Management of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : a clinician ' s guide. *Ther. Adv. Hematol.* **8**, 119–126 (2017).
 25. Dacie JV, L. S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease. *Ser Haematol.* **5**, 3–23 (1972).
 26. Wang, H., Chuhjo, T., Yasue, S., Omine, M. & Nakao, S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* **100**, 3897–3902 (2002).
 27. Latour, P. De *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : natural history of disease subcategories. *Blood* **112**, 3099–3106 (2008).
 28. Dührsen, U., Lammert, F. & Röth, A. Persisting Hyperbilirubinemia in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Chronically Treated with Eculizumab: The Role of Hepatocanalicular Transporter Variants. *Eur J Haematol.* **99**, 350–356
 29. Hill, A. *et al.* Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* **95**, 567–73 (2010).
 30. Risitano, a M., Perna, F. & Selleri, C. Achievements and limitations of complement inhibition by eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the role of complement component 3. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 528–35 (2011).
 31. Risitano, A. M. *et al.* Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. **113**, 4094–4101 (2016).
 32. Lindorfer, M. a *et al.* A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement-mediated cytolysis and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement. *Blood* **115**, 2283–91 (2010).
 33. Risitano, A. M. & Marotta, S. Toward complement inhibition 2.0: Next generation anticomplement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am. J. Hematol.* **93**, 564–577 (2018).
 34. Sica, M. *et al.* Eculizumab treatment: Stochastic occurrence of C3 binding to individual PNH erythrocytes. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 1–10 (2017).
 35. Lazarowski, A. *et al.* Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab. *N. Engl. J. Med.* **370**, 632–639 (2014).
 36. Rondelli, T. *et al.* Polymorphism of the complement receptor 1 gene correlates with the hematologic response to eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* **99**, 262–266 (2014).
 37. Parker, C. *et al.* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **106**, 3699–3709 (2005).

38. Correia, R. P. *et al.* Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein (São Paulo)* **14**, 366–373 (2016).
39. Schrezenmeier, H. *et al.* Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica* **99**, 922–9 (2014).
40. Brodsky, R. A. *et al.* Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **111**, 1840–1847 (2008).
41. Hillmen, P. *et al.* The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1233–1243 (2006).
42. Kelly, R. J. *et al.* Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : sustained efficacy and improved survival. *Blood* **117**, 6786–6792 (2011).
43. Schubert, J. & Röth, A. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: On the long way to understand the principles of the disease. *Eur. J. Haematol.* **94**, 464–473 (2015).
44. Ueda, Y., Obara, N., Yonemura, Y., Noji, H. & Masuko, M. Effects of eculizumab treatment on quality of life in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Int. J. Hematol.* (2018). doi:10.1007/s12185-018-2409-3
45. Mckeage, K. Eculizumab A Review of its Use in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. **71**, 2327–2345 (1996).
46. Kamranzadeh Fumani, H. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : a retrospective single - center study. *Hematol. Oncol.* **35**, 935–938 (2016).
47. Sung-Eun Lee, Sung Soo Park, Young-Woo Jeon, Jae-Ho Yoon, Byung- Sik Cho, Ki-Sung Eom, Yoo-Jin Kim, Seok Lee, Chang-Ki Min, Hee-Je Kim, Seok-Goo Cho, Dong-Wook Kim, Woo-Sung Min, and J. W. L. Outcomes of allogeneic stem cell transplantation in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with or without aplastic anemia. *Eur J Haematol.* **99**, 336–343 (2017).
48. de Latour, R. P. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* **97**, 1666–1673 (2012).
49. Peffault de Latour, R. Transplantation for bone marrow failure: current issues. *ASH Educ. Progr. B.* **2016**, 90–98 (2016).
50. Rotoli, B. & Boccuni, P. The PIG-A gene somatic mutation responsible for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* **80**, 539–545 (1995).
51. Nishimura, J., Murakami, Y. & Kinoshita, T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am. J. Hematol.* **62**, 175–82 (1999).
52. Parker, C. J. Update on the diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* **2016**, 208–216 (2016).
53. Johnston, J. J. *et al.* The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 295–300 (2012).
54. Nafa, K., Mason, P., Hillmen, P., Luzzatto, L. & Bessler, M. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. *Blood* **86**, 4650–4655 (1995).

55. Nafa, K., Bessler, M., Castro-Malaspina, H., Jhanwar, S. & Luzzatto, L. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells, Mol. Dis.* **24**, 370–384 (1998).
56. Endo, M. *et al.* Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **87**, 2546–2557 (1996).
57. Yamada, N. *et al.* Somatic mutations of the PIG-A gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **85**, 885–92 (1995).
58. Yoon, J. H., Cho, H. I., Park, S. S., Chang, Y. H. & Kim, B. K. Mutation analysis of the PIG-A gene in Korean patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J Clin Pathol* **55**, 410–413 (2002).
59. Pramoonjago, P. *et al.* Genotypic, immunophenotypic and clinical features of Thai patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **105**, 497–504 (1999).
60. Mortazavi, Y. *et al.* The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): A high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood* **101**, 2833–2841 (2003).
61. Okamoto, M. *et al.* High frequency of several PIG-A mutations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **20**, 627–634 (2006).
62. Clemente, M. J. *et al.* Clonal PIGA mosaicism and dynamics in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leukemia* 1–5 (2018). doi:10.1038/s41375-018-0138-5
63. Araten, D. J., Nafa, K., Pakdeesuwan, K. & Luzzatto, L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Med. Sci.* **96**, 5209–5214 (1999).
64. Hu, R. *et al.* PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* **105**, 3848–3854 (2005).
65. Carvalho, R Franco De; Arruda, VR; Saad, STO; Costa, F. Detection of somatic mutations of the PIG-A gene in Brazilian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Braz J Med Biol Res* **55**, 763–766 (2001).
66. Bidoia, B. G. Identificação E Caracterização De Células Clonais Deficientes Em Glicosil-fosfatidil-inositol Em Portadores De Anemia Aplástica E De Hemoglobinúria Paroxística Noturna. (Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2004).
67. Courant F, Antignac, J., Dervilly-pinel, G. & Bizec, B. Le. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* 2014, **14**, 2369–2388 (2014).
68. Adamski, J. & Suhre, K. Metabolomics platforms for genome wide association studies — linking the genome to the metabolome. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 39–47 (2013).
69. Icard, P. & Lincet, H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 423–433 (2012).
70. Aspects, C., Reuter, S. E. & Evans, A. M. Carnitine and Acylcarnitines. *Clin Pharmacokinet* **51**, 553–572 (2012).
71. Nelson, DL; Cox, M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* (2011).
72. Chen, J. & Russo, J. Dysregulation of glucose transport , glycolysis , TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 370–384 (2012).

73. Chen, W. *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood* **124**, 1645–1655 (2015).
74. Steiner, N. *et al.* The metabolomic plasma profile of myeloma patients is considerably different from healthy subjects and reveals potential new therapeutic targets. *PLoS One* **18**, 1–13 (2018).
75. Deguchi, H. *et al.* Acylcarnitines are anticoagulants that inhibit factor Xa and are reduced in venous thrombosis , based on metabolomics data. **126**, 1595–1601 (2015).
76. Zhong, P., Zhang, J. & Cui, X. Abnormal metabolites related to bone marrow failure in aplastic anemia patients. *Genet. Mol. Res.* **14**, 13709–13718 (2015).
77. Darghouth, D. *et al.* Pathophysiology of sickle cell disease is mirrored by the red blood cell metabolome. *Blood* **117**, 1–4 (2016).
78. Zhang, Y. *et al.* Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 2750–2761 (2014).
79. Ioannis Papassotiriou, Fottes Panetsos, Theodora Livadara, Maria Dimopoulou, A. T. and E. V. Targeted Metabolomic Profiles Are Strongly Correlated With Metabolic Alterations In Patients With Sickle Cell/Beta Thalassemia Disease. *Blood* **122**, 4675 (2013).
80. Musharraf, S. G., Iqbal, A., Ansari, S. H. & Par, S. β -Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals. *Nat. Sci. reports* 1–10 (2017). doi:10.1038/srep42249
81. Kumar, S. *et al.* Impaired acylcarnitine profile in transfusion-dependent beta-thalassemia major patients in Bangladesh. *J. Adv. Res.* **12**, 55–66 (2018).
82. Iqbal, A., Ansari, S. H., Parveen, S. & Khan, I. A. Hydroxyurea Treated β -Thalassemia Children Demonstrate a Shift in Metabolism Towards Healthy Pattern. *Nat. Sci. reports* **8**, 1–9 (2018).
83. Gomes, I. B. R. Perfil metabolômico em pacientes com anemia hemolítica autoimune. *Tese Doutorado apresentada a Esc. Paul. Med.* (2018).
84. VITTORIO ROSTI. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* **85**, 82–87 (2000).
85. Hall, C., Richards, S. & Hillmen, P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* **102**, 3587–3591 (2003).
86. Helley, D. *et al.* Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* **95**, 574–581 (2010).
87. Weitz, I. C. *et al.* Eculizumab therapy results in rapid and sustained decreases in markers of thrombin generation and inflammation in patients with PNH independent of its effects on hemolysis and microparticle formation. *Thromb. Res.* **130**, 361–8 (2012).
88. Kokoris, S. I. *et al.* Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. *Hematology* **5332**, 1–9 (2018).
89. Röth, A., Alashkar, F., Herich-Terhürne, D. & Dührsen, U. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: To prednisone or not to prednisone? - A case report of a patient previously treated with steroids for 15yrs and significant response on eculizumab. *Eur. J. Haematol.* **95**, 177–180 (2015).
90. Brodsky, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **124**, 2804–2812 (2015).
91. Long, Z., Du, Y., Li, H. & Han, B. CR1 gene polymorphisms in Chinese patients

- with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Gene* **659**, 149–154 (2018).
92. Nishimura, J. *et al.* Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N. Engl. J. Med.* **370**, 632–9 (2014).
 93. Sicre de Fontbrune, F. & Peffault de Latour, R. Ten Years of Clinical Experience With Eculizumab in Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Semin. Hematol.* **55**, 124–129 (2018).
 94. Meri, S. Spontaneous Remission in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria — Return to Health or Transition Into Malignancy ? *Front Immunol* **9**, 1–5 (2018).
 95. Kamranzadeh Fumani, H. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective single-center study. *Hematol. Oncol.* **35**, 935–938 (2017).
 96. Pavlu, J. *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria due to an 88 bp direct tandem repeat insertion in the PIG-A gene. *Br. J. Haematol.* **98**, 289–291 (1997).
 97. Araten, D. J. & Luzzatto, L. The mutation rate in PIG-A is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* **108**, 734–736 (2006).
 98. Luzzatto, L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 317–322 (2006).
 99. Savage, W. J. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH. *Exp. Hematol.* **37**, 42–51.e1 (2009).
 100. Almeida, A. M. *et al.* Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat. Med.* **12**, 846–51 (2006).
 101. Kvarnung, M. *et al.* A novel intellectual disability syndrome caused by GPI anchor deficiency due to homozygous mutations in PIGT. *J. Med. Genet.* **50**, 521–528 (2013).
 102. Krawitz, P. M. *et al.* A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* **122**, 1312–1315 (2013).
 103. Luzzatto, L. PNH from mutations of another PIG gene. *Blood* **122**, 1099–1100 (2013).
 104. Brodsky, R. A. & Hu, R. PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and in normal hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma* **47**, 1215–1221 (2006).
 105. Araten, D. J. *et al.* Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): No evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia* **16**, 2243–2248 (2002).
 106. Sugimori, C. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and concurrent JAK2V617F mutation. *Blood Cancer J.* **2**, e63–e63 (2012).
 107. Shen, W. *et al.* Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* **124**, 4529–4538 (2014).
 108. Murakami, Y. *et al.* Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* **156**, 383–7 (2012).
 109. Ikeda, K. *et al.* 3' UTR-truncated Hmga2 cDNA causes MPN-like hematopoiesis by conferring a clonal growth advantage at the level of HSC in mice. *Blood* **117**, 5860–5869 (2011).
 110. Mccoin, C. S., Knotts, T. A. & Adams, S. H. Acylcarnitines—old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat Rev Endocrinol.* **11**, 617–625 (2016).

111. Baruteau, J. & Sachs, P. Clinical and biological features at diagnosis in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects : a French pediatric study of 187 patients. *J Inherit Metab Dis* **37**, 137–9 (2014).
112. Luo, N. *et al.* Plasma acylcarnitines are associated with pulmonary hypertension. *Pulm Circ* **7**, 211–8 (2017).
113. Hunter, W. G. *et al.* Metabolomic Profiling Identifies Novel Circulating Biomarkers of Mitochondrial Dysfunction Differentially Elevated in Heart Failure Shared Metabolic Impairments in Clinical Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **29**, (2016).
114. K. S. Cho, P. P. Lysis of erythrocytes by long-chain acyl esters of carnitine. *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 30–35 (1969).
115. Paapstel, K. *et al.* Serum phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholines are inversely related to vascular damage and heart rate in patients with atherosclerosis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **28**, 44–52 (2018).
116. Siguener, A. *et al.* Glycerophospholipid and Sphingolipid Species and Mortality : The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
117. Morris, C. R. Alterations of the Arginine Metabolome in Sickle Cell Disease A Growing Rationale for Arginine Therapy. *Hematol. Clin. NA* **28**, 301–321 (2014).
118. Bakshi, N. & Morris, C. R. The role of the arginine metabolome in pain : implications for sickle cell disease. *J. Pain Res.* **9**, 167–175 (2016).
119. Ito, T. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics to identify taurine-modified metabolites in heart. *Amino Acids* **50**, 117–124 (2018).
120. Marcinkiewicz, J. & Kontny, E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* **46**, 7–20 (2014).
121. Hasokawa, M. *et al.* Identification of biomarkers of stent restenosis with serum metabolomic profiling using gas chromatography/mass spectrometry. *Circ J* **76**, 1864–1873 (2012).
122. Satoh, H. & Sperelakis, N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. *Gen. Pharmacol.* **30**, 451–463 (1998).
123. Birukou, I., Schweers, R. L. & Olson, J. S. Distal Histidine Stabilizes Bound O₂ and Acts as a Gate for Ligand Entry in Both Subunits of Adult Human Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **285**, 8840–8854 (2010).
124. Hisamatsu, T. *et al.* Novel , Objective , Multivariate Biomarkers Composed of Plasma Amino Acid Profiles for the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* **7**, e31131 (2012).
125. Son, D. O., Satsu, H. & Shimizu, M. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS* **29834 FEBS Lett.** **579**, 4671–4677 (2005).
126. Watanabe, M., Suliman, M. E., Qureshi, A. R., Garcia-lopez, E. & Ba, P. Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients : associations with inflammation , oxidative stress , and. *Am J Clin Nutr* **1860–6**, 1860–1866 (2008).
127. Cheng, M., Huang, Y., Mao, C., Ho, H. & Yang, N. Metabolic Disturbances Identified in Plasma Are Associated With Outcomes in Patients With Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 1509–20 (2015).
128. Jones, A. L., Hulett, M. D. & Parish, C. R. Histidine-rich glycoprotein : A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune , vascular and coagulation systems. *Immunol. Cell Biol.* 106–118 (2005).

129. Vu, T. T. *et al.* Histidine-rich glycoprotein binds DNA and RNA and attenuates their capacity to activate the intrinsic coagulation pathway. *Thromb. Haemost.* 89–98 (2016).

8. Anexos

8.1. Tabelas

Tabela 1a. Detalhes das mutações encontradas do gene PIG-A em cada paciente estudado

Paciente	Grupo	Mutação	AA	Localização genômica (GRCh38 - hg38)	Localização	Tipo	Mutation Taster	Polyphen 2	rs (dbSNP)	Incidência populacional
1	1	c.1004G>A (p.Gly335Glu)	Gly→Glu	15324849C>T	éxon 5	Missense	Provável patogênico 0,99	Provável patogênico 1,00	-	-
2	1	c.564T>G (P.Ser188Arg)	Ser→Arg	15331367A>C	éxon 2	Missense	Provável patogênico 0,99	Provável patogênico 1,00	-	-
2		c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
2		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
3	1	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
3		c.983_985delTTG		15324868_15324870delCAA	éxon 5	Frameshift	Provável patogênico 0,99		-	-
3		c.982G>T (p.V328F)	Val→Phe	15324871C>A	éxon 5	Missense	Provável patogênico 0,99		-	-
4	1	c.-116-13A>G			5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
4		c.549T>A (p.C183*)		15331382A>T	Éxon 2	Nonsense	Provável patogênico 1,00		-	-
5	2	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
5		c.264_265insA		15331666_15331667insT	Éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
5		c.840delG	-	15325922delC	éxon 3	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
5		c.984delT	-	15324869delA	éxon 5	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
6	1	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
6		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
6		c.944G>T (p.Cys315Phe)	Cys→Phe	15325057C>A	éxon 4	Missense	Provável patogênico 0,99	Provável patogênico 0,99	-	-
7	1	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
7		c.878_896delAGGATGTTAGAAAT GTCTT	-	15325105_15325123delAAGACATTTCTAAC ATCCT	éxon 4	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
8	1	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
8		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
8		c.234delA		15331697delT	Éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
8		c.*7G>T		15321499C>A	3' UTR		*Benigno- Clinvar			A=0.0037/14 (1000 Genomes)
8		c.832delT	-	15325930delA	éxon 3	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
9	1	c.-116-104T>A		15335658A>T	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs116740080	-

Paciente	Grupo	Mutação	AA	Localização genômica (GRCh38 - hg38)	Localização	Tipo	Mutation Taster	Polyphen 2	rs (dbSNP)	Incidência populacional
9		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
9		c.55C>T (p.Arg19Trp)	Arg→Trp	15331876G>A	éxon 2	Missense	Polimorfismo 0,99	Benigno 0	rs34422225	A=0.0246/93 (1000 Genomes)
9		c.981+8G>A		15325012C>T	Íntron 4		Desconhecido (ClinVar) Human splicing finder: sem impacto no splicing		rs778602062	T=0.0003/24 (ExAC)
10	1	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
10		c.577_581delGTACT	-	15331350_15331354delAGTAC	éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,0		-	-
10		c.908_909delAT		15325092_15325093delAT	Éxon 4	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
11	1	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
11		c.577_581delGTACT	-	15331350_15331354delAGTAC	éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,0		-	-
11		c.853C>G (p.Arg285Gly)	Arg→Gly	15325148T>C	éxon 4	Missense	Provável patogênico 0,9	Benigno 0,266	-	-
12	1	c.-116-104T>A		15335658A>T	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs116740080	-
12		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
12		c.55C>T (p.Arg19Trp)	Arg→Trp	15331876G>A	éxon 2	Missense	Polimorfismo 0,99	Benigno 0	rs34422225	A=0.0246/93 (1000 Genomes)
12		c.548G>A (p.Cys183Tyr)	Cys→Tyr	15331383C>T	Éxon 2	Missense	Provável patogênico 0,9	Provável patogênico 1,00	-	-
13	1	Nenhuma								
14	1	c.981+2T>C	-	15325018A>G	íntron 4	5' Splice site	Human splice finder; provavelmente afeta splicing		-	-
15	1	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
15		c.1049_1053delCTTCA	-	15324800_15324804delTGAAG	éxon 5	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
16	3	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
17	3	Nenhuma								
18	3	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
18		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
19	3	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
20	2	Nenhuma								
21	2	c.-116-104T>A		15335658A>T	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs116740080	-

Paciente	Grupo	Mutação	AA	Localização genômica (GRCh38 - hg38)	Localização	Tipo	Mutation Taster	Polyphen 2	rs (dbSNP)	Incidência populacional
21		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
21		c.55C>T (p.Arg19Trp)	Arg→Trp	15331876G>A	éxon 2	Missense	Polimorfismo 0,99	Benigno 0	rs34422225	A=0.0246/93 (1000 Genomes)
21		c.715+1G>A	-	15331215C>T	íntron 2	5' Splice site		Human splicing finder: altera o splicing	-	-
22	3	c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
23	3	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
23		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
24	1	c.142G>T (p.Gly48Cys)	Gly→Cys	15331789C>A	éxon 2	Missense	Provável patogênico 0,99	Provável patogênico 1,00	-	-
25	1	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
25		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
25		c.453delC	-	15331478delG	éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
26	1	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
26		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
27	2	c.336delG	-	15331595delC	éxon 2	Frameshift	Provável patogênico 1,00		-	-
28	1	Nenhuma								
29	1	c.944G>A p.Cys315Tyr	Cys→Tyr	15325057C>T	éxon 4	Missense	Provável patogênico 0,99	Provável patogênico 0,96	-	-
30	3	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
30		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)
31	3	c.-116-311G>C		15335865C>G	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs6632348	G: 36% C: 64% (Ensembl)
31		c.-116-13A>G		15335567T>C	5'		Desconhecido	Desconhecido	rs4830938	T=0.1343/507 (1000 Genomes)

Tabela 2a. Metabólitos estudados em pacientes com HPN com a respectiva significância estatística em relação aos 166 controles normais.

Metabólitos	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
C16:2-OH	-0,93	-34,44	1,02E-82	2,08E-80
C6:1	0,81	18,72	1,21E-44	1,04E-42
C6	-0,71	-34,44	1,20E-82	2,08E-80
C16-OH	0,48	7,47	3,08E-12	8,80E-11
C18	0,44	6,70	2,38E-10	5,87E-09
C12:1	-0,55	-8,90	4,90E-16	2,12E-14
C142-OH	-0,44	-6,61	4,09E-10	8,85E-09
C18:1	0,44	6,37	1,41E-09	2,71E-08
C3-OH	0,38	5,56	9,48E-08	1,07E-06
C16	0,41	6,07	7,05E-09	1,11E-07
C10:1	-0,54	-8,77	1,13E-15	3,90E-14
C18:2	0,32	4,65	6,26E-06	4,17E-05
Aspartato	-0,41	-6,16	4,49E-09	7,76E-08
Taurina	-0,40	-6,00	1,01E-08	1,45E-07
Espermidina	0,42	5,41	2,69E-07	3,35E-06
PC ae C40:3	-0,39	-5,01	1,62E-06	1,88E-05
PC aa C34:2	-0,33	-4,70	5,08E-06	4,13E-05
C14:1	-0,33	-4,80	3,18E-06	2,75E-05
PC aa C30:2	0,37	4,70	6,15E-06	5,94E-05
C16:1	0,37	5,38	2,18E-07	0,0002
PC aa C40:3	-0,40	-5,95	1,32E-08	0,0001
C12-DC	0,34	4,28	3,45E-05	0,0003
PC aa C36:3	-0,30	-4,34	2,31E-05	0,0001
Histidina	-0,32	-4,56	9,17E-06	0,0006
C18:1	-0,33	-4,09	7,32E-05	0,0005
C14:2	-0,32	-4,68	5,42E-06	0,0004
PC aa C36:2	-0,31	-3,90	0,0001	0,0010

Metabólitos	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
PC ae C42:3	-0,31	-3,89	0,0002	0,0010
PC aa C40:1	-0,31	-3,80	0,0002	0,0013
C0	-0,31	-3,78	0,0002	0,0013
Glutamato	-0,34	-4,95	0,0001	0,0018
PC ae C38:2	-0,29	-3,54	0,0005	0,0030
lysoPC a C20:3	-0,28	-3,47	0,0007	0,0036
PC aa C32:2	-0,28	-3,44	0,0008	0,0039
Valina	-0,28	-3,41	0,0008	0,0042
C6 C41-DC	-0,28	-3,37	0,0010	0,0046
PC ae C38:3	-0,27	-3,34	0,0011	0,0050
C162	0,38	5,53	0,0010	0,0012
PC aa C42:2	-0,27	-3,30	0,0012	0,0053
PC aa C36:0	-0,27	-3,30	0,0012	0,0053
Alanina	-0,27	-3,29	0,0013	0,0053
PC ae C36:1	-0,27	-3,28	0,0013	0,0053
Glutamina	-0,27	-3,28	0,0013	0,0053
PC aa C36:4	-0,27	-3,28	0,0013	0,0053
PC aa C34:3	-0,27	-3,26	0,0014	0,0054
PC aa C40:2	-0,27	-3,24	0,0015	0,0055
Arginina	-0,27	-3,24	0,0015	0,0055
PC aa C42:0	-0,26	-3,23	0,0015	0,0056
PC aa C38:6	-0,26	-3,22	0,0016	0,0057
PC ae C44:6	-0,26	-3,18	0,0018	0,0063
PC aa C26:0	0,26	3,16	0,0019	0,0065
PC ae C44:3	-0,25	-3,10	0,0024	0,0079
PC aa C36:6	-0,25	-2,99	0,0033	0,0106
PC aa C34:1	-0,25	-2,98	0,0034	0,0106
Ornitina	0,25	2,98	0,0034	0,0106

Metabólitos	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
PC aa C38:3	-0,24	-2,93	0,0040	0,0125
PC aa C34:4	-0,24	-2,86	0,0050	0,0151
PC ae C40:1	-0,23	-2,81	0,0057	0,0171
lysoPC a C18:0	-0,23	-2,80	0,0058	0,0171
C102	-0,23	-2,78	0,0061	0,0176
lysoPC a C26:1	0,23	2,78	0,0062	0,0176
PC ae C42:0	-0,23	-2,77	0,0063	0,0177
PC aa C32:3	-0,23	-2,76	0,0065	0,0179
PC aa C38:5	-0,23	-2,75	0,0067	0,0182
PC ae C36:0	-0,23	-2,74	0,0069	0,0184
PC ae C40:2	-0,22	-2,69	0,0080	0,0212
C14	-0,22	-2,68	0,0084	0,0217
PC aa C42:1	-0,22	-2,67	0,0085	0,0218
PC ae C34:3	-0,22	-2,65	0,0089	0,0225
Leucina	-0,22	-2,64	0,0092	0,0228
PC aa C36:5	-0,21	-2,54	0,0120	0,0295
PC ae C42:1	-0,21	-2,51	0,0131	0,0317
C12	-0,21	-2,49	0,0140	0,0334
PC ae C44:5	-0,21	-2,48	0,0142	0,0334
C14:1-OH	-0,21	-2,47	0,0147	0,0340
C3	0,20	2,44	0,0159	0,0365
Serina	-0,20	-2,43	0,0163	0,0368
PC ae C30:0	0,20	2,42	0,0166	0,0370
PC ae C38:1	-0,20	-2,42	0,0168	0,0370
PC ae C38:0	-0,20	-2,41	0,0171	0,0372
PC aa C42:6	-0,20	-2,41	0,0173	0,0372
lysoPC a C24:0	-0,20	-2,37	0,0190	0,0400
Metionina	-0,20	-2,37	0,0191	0,0400

Metabólitos	Correlação	T-Stat	Valor de p	FDR
PC aa C38:4	-0,20	-2,35	0,0201	0,0413
PC ae C30:1	0,20	2,35	0,0202	0,0413
PC aa C42:5	-0,19	-2,32	0,0217	0,0440
PC ae C36:2	-0,19	-2,27	0,0245	0,0490
PC aa C32:1	-0,18	-2,20	0,0298	0,0589
PC ae C42:5	-0,18	-2,10	0,0379	0,0741
PC ae C36:5	-0,17	-2,04	0,0429	0,0824
Asparagina	0,17	2,04	0,0431	0,0824
lysoPC a C26:0	0,17	2,01	0,0462	0,0874

8.2. Figuras

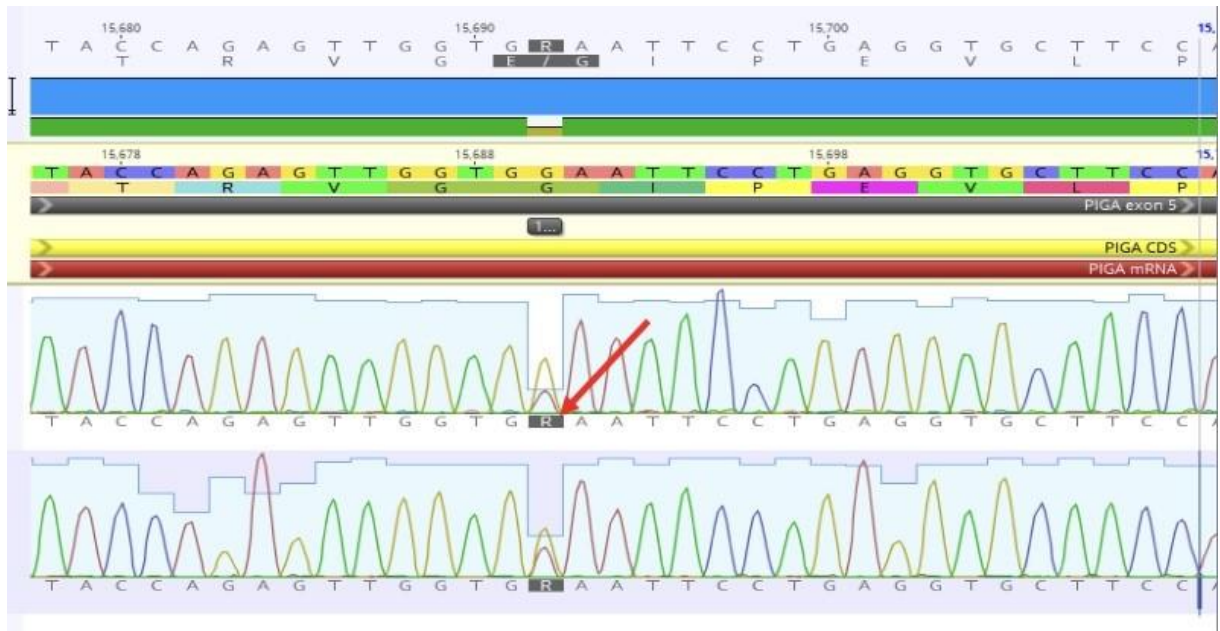


Figura 1a. Paciente 1.

c.1004G>A (p.Gly335Glu). Mutação em *missense* localizada no éxon 5, com troca de aminoácido glicina por glutamato.



Figura 2a. Pacientes 2, 6, 18, 23, 25, 26, 30 e 31

c.-116-311G>C. Mutação localizada em região 5', não classificada.



Figura 3a. Pacientes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 31

c.-116-13A>G. Mutação localizada em região 5', não classificada.

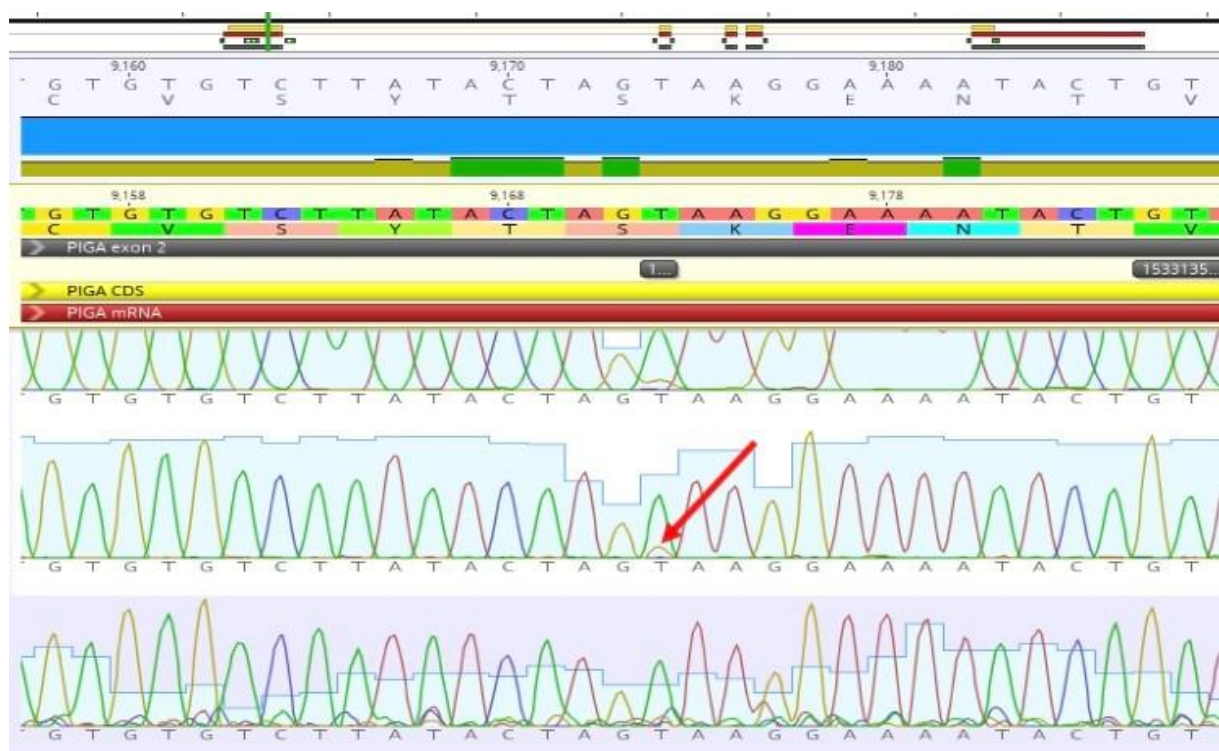


Figura 4a. Paciente 2.

c.564T>G (P.Ser188Arg). Mutação em *missense* localizada no éxon 2, com troca de aminoácido serina por arginina.



Figura 5a. Paciente 3

c.983_985delTTG. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 5.



Figura 6a. Paciente 3.

c.982G>T (p.V328F). Mutação em *missense* localizada no éxon 5, com troca de aminoácido valina por fenilalanina.



Figura 7a. Paciente 4.

c.549T>A (p.C183*). Mutação em *nonsense* localizada no éxon 2.

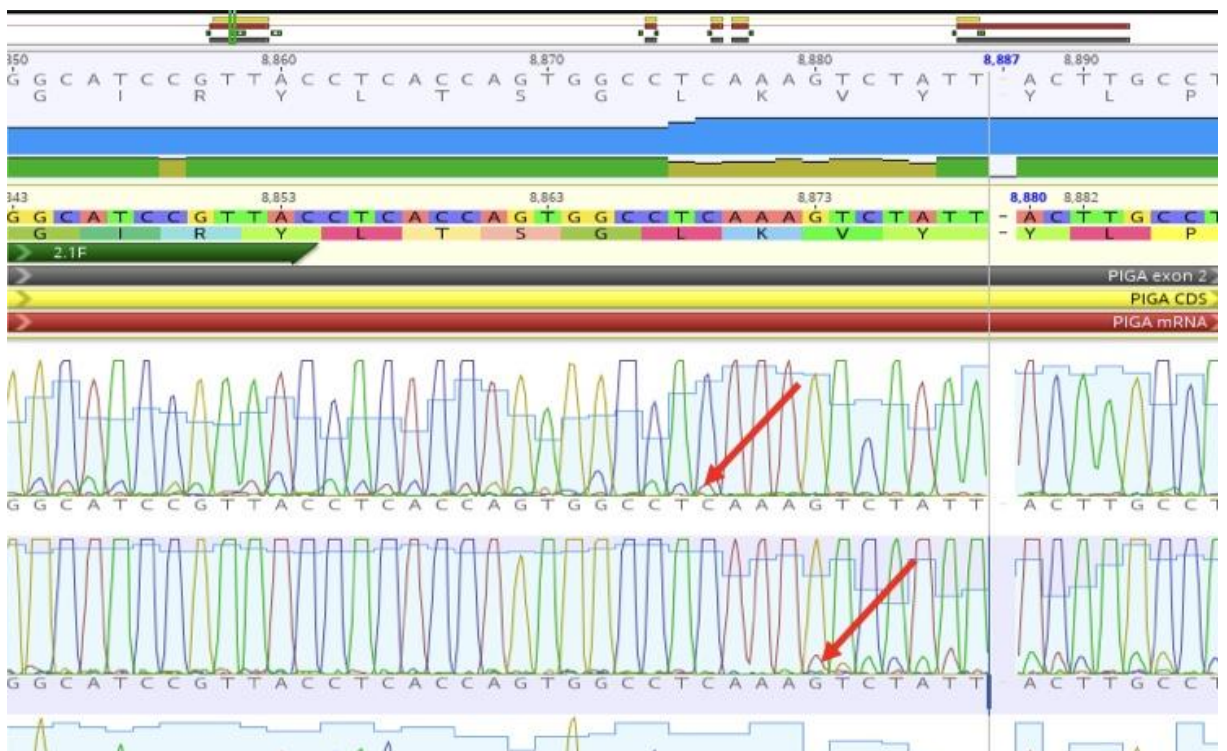


Figura 8a. Paciente 5.

c.264_265insA. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 2.



Figura 9a. Paciente 5

c.840delG. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 3.



Figura 10a. Paciente5

c.984delT . Mutação em *frameshift* localizada no éxon 5.



Figura 11a. Paciente 6.

c.944G>T (p.Cys315Phe). Mutação em *missense* localizada no éxon 4, com troca de aminoácido cisteína por fenilalanina.



Figura 12a. Paciente 7

c.878_896delAGGATGTTAGAAATGTCTT. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 4.



Figura 13a. Paciente 8

c.234delA. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 2.



Figura 14a. Paciente 8.

c.832delT. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 3.



Figura 15a. Paciente 8.

c.*7G>T. Mutação encontrada em região 3', não classificada.



Figura 16a. Paciente 9, 12, 21.

c.-116-104T>A. Mutação encontrada em região 5', não classificada.

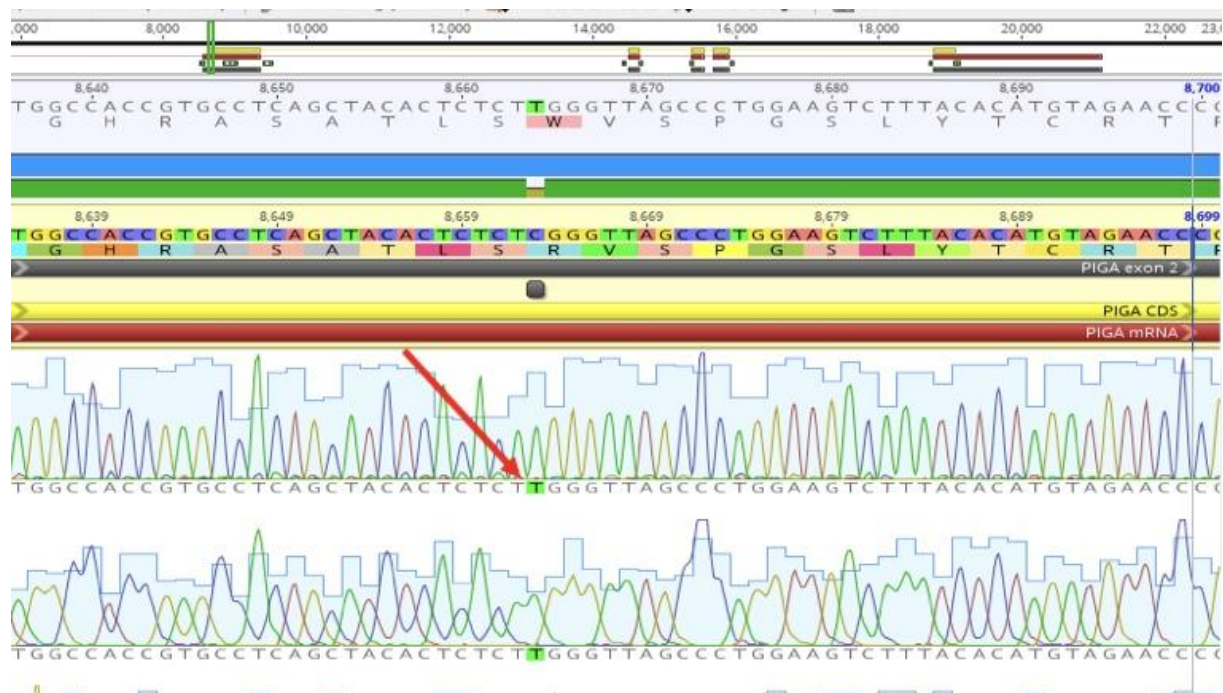


Figura 17a. Pacientes 9, 12, 21

c.55C>T (p.Arg19Trp). Mutação em *missense* localizada no éxon 2, com troca de aminoácido arginina por triptofano.



Figura 18a. Paciente 9

c.981+8G>A. Mutação localizada no íntron 4, não classificada.



Figura 19a. Pacientes 10 e 11

c.577_581delGTACT. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 2.

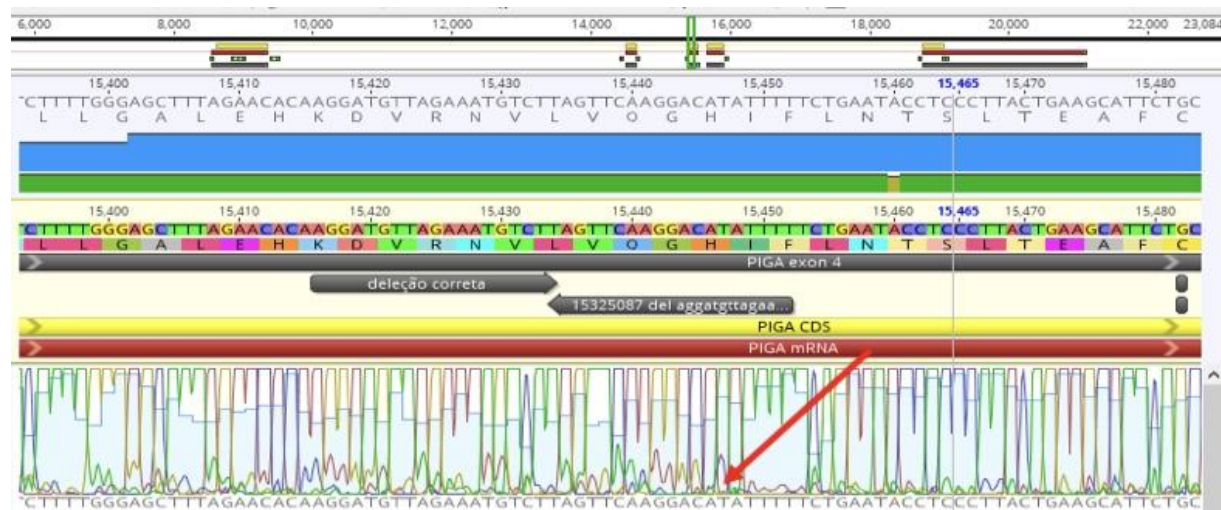


Figura 20a. Paciente 10

c.908_909delAT. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 4.



Figura 21a. Paciente 11

c.853C>G (p.Arg285Gly). Mutação em *missense* localizada no éxon 4, com troca de aminoácido arginina por glicina.



Figura 22a. Paciente 12

c.548G>A (p.Cys183Tyr). Mutação em *missense* localizada no éxon 2, com troca de aminoácido cisteína por tirosina.



Figura 23a. Paciente 14

c.981+2T>C. Mutação em 5' splice site, localizada no íntron 4.



Figura 24a. Paciente 15

c.1049_1053delCTTCA. Mutação em frameshift localizada no éxon 5.

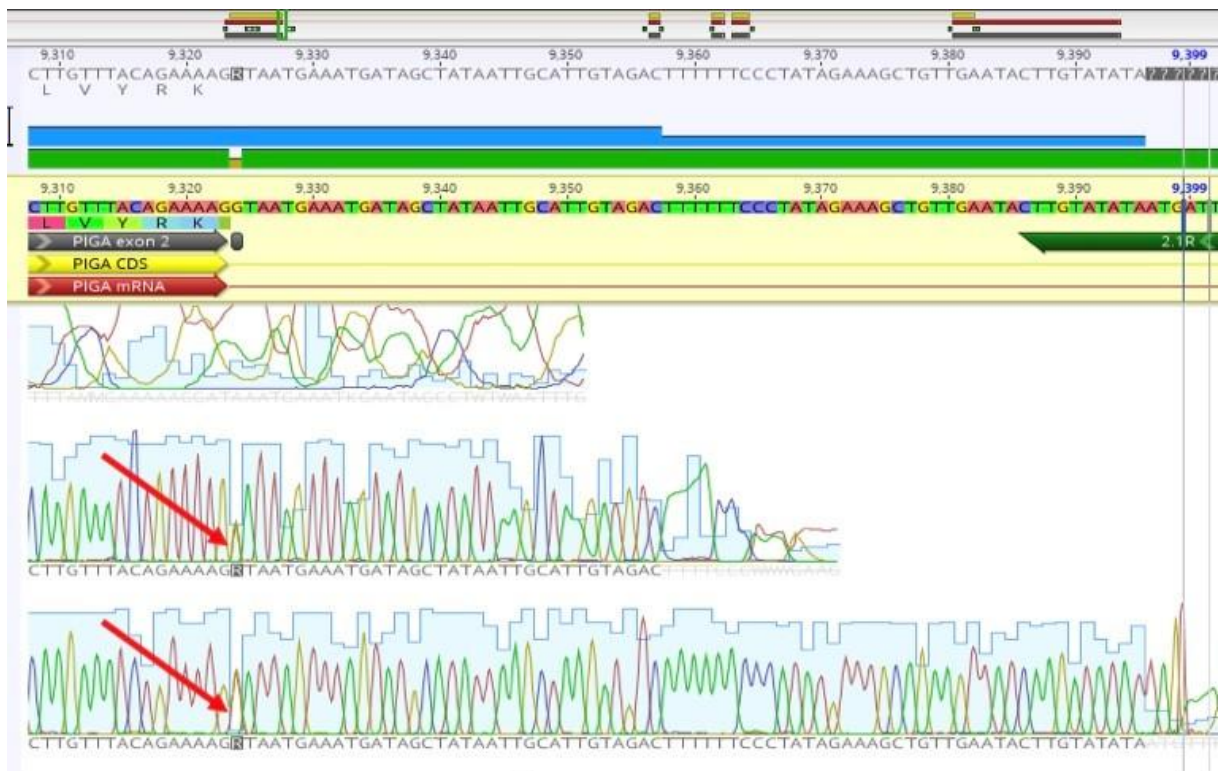


Figura 25a. Paciente 21

c.715+1G>A. Mutação em 5' splice site, localizada no íntron 2.



Figura 26a. Paciente 24

c.142G>T (p.Gly48Cys). Mutação em missense localizada no éxon 2, com troca de aminoácido glicina por cisteína.

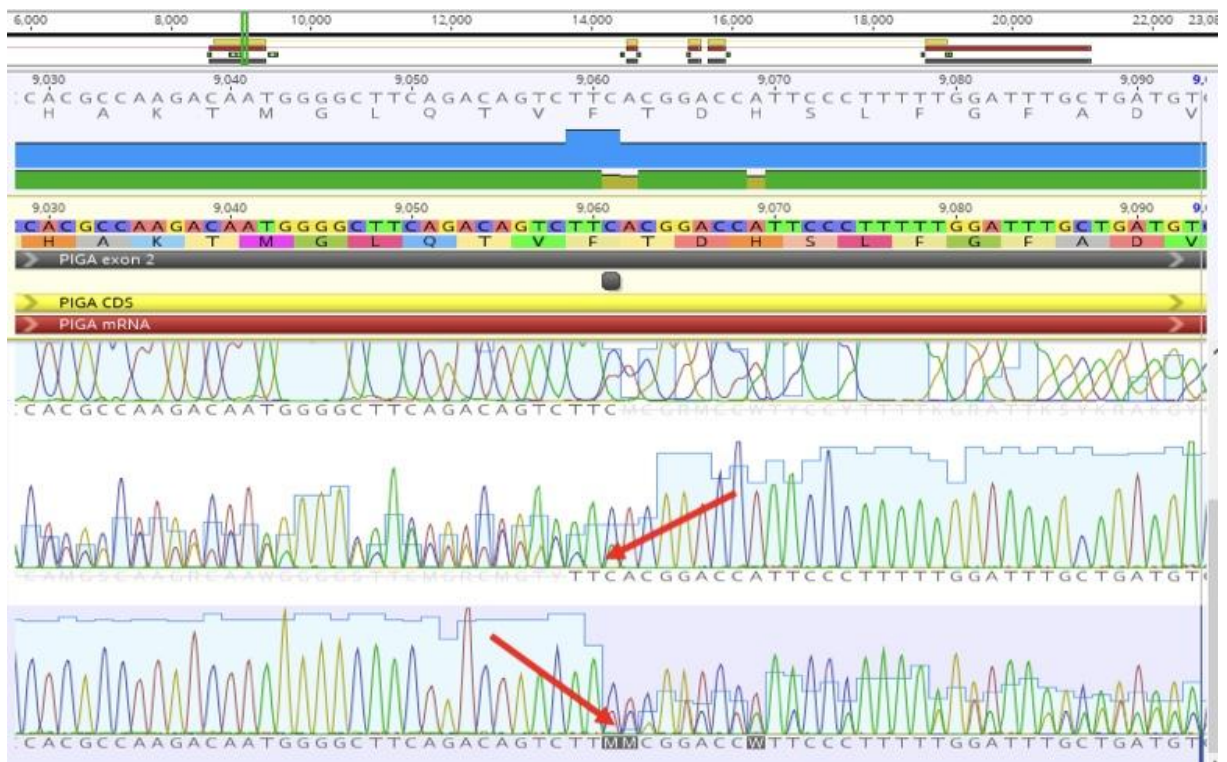


Figura 27a. Paciente 25

c.453delC. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 2.



Figura 28a. Paciente 27

c.336delG. Mutação em *frameshift* localizada no éxon 2.



Figura 29a. Paciente 29

c.944G>A p.Cys315Tyr. Mutação em *missense*, localizada no éxon 4, com troca de aminoácido cisteína por tirosina.

8.3. Cartas de aprovação dos Comitês de Ética de cada instituição participante.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE PIG-A E AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO EM PORTADORES DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA (HPN)

Pesquisador: Patricia Eiko yamakawa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38185414.8.1001.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 933.133

Data da Relatoria: 13/01/2015

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP. 897.252 de 3/12/2014

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 897.252 de 3/12/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP. 897.252 de 3/12/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 897.252 de 3/12/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de respostas de pendencia apontadas no parecer inicial

Recomendações:

PESQUISADORA INFORMA QUE O PROJETO SERÁ FINANCIADO PELA FAPESP. APRESENTAR A CARTA DE APROVAÇÃO DA FAPESP, ASSIM QUE OBTIDA POR NOTIFICAÇÃO AO CEP-UNIFESP.

PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO, SEJA PACIENTE OU CONTROLE, DEVE SER INFORMADO O ENDEREÇO E TEL DO CEP DA UNIFESP E NÃO DO HSL. FAVOR ADEQUAR NOS 2 TCLEs E

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 933.133

COMO NOTIFICAÇÃO AO CEP-UNIFESP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências apontadas no parecer inicial

1-Será necessário enviar carta de ciência e autorização do responsável pelo local onde será feito o estudo (Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP)

ANÁLISE: APRESENTOU CARTA ASSINADA PELO RESPONSÁVEL PELO SETOR ONDE A PESQUISA SERÁ REALIZADA. PENDÊNCIA ATENDIDA

2-Como e onde serão recrutados os participantes saudáveis?

ANÁLISE: PACIENTES DO GRUPO CONTROLE SERÃO RECRUTADOS NO BANCO DE SANGUE DO HEMOCENTRO DA UNIFESP/EPM. PENDÊNCIA ATENDIDA

3-O protocolo com os participantes saudáveis será o mesmo? Será coletado sangue 1 ou 2 vezes?

ANÁLISE: PESQUISADORA ESCLARECE QUE, NOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE, SERÁ COLETADO SANGUE APENAS UMA VEZ. ESTA INFORMAÇÃO CONSTA DO TCLE. PENDÊNCIA ATENDIDA

4- No projeto detalhado e no cadastro CEP/UNIFESP está informado que o projeto será patrocinado pela FAPESP. Já no TCLE, está dito que o patrocinador será o : Fleury Medicina e Saúde, o qual não é citado no formulário nem no projeto detalhado. Favor esclarecer.

ANÁLISE: PESQUISADORA INFORMA QUE O PROJETO SERÁ FINANCIADO PELA FAPESP.APRESENTAR A CARTA DE APROVAÇÃO DA FAPESP, ASSIM QUE OBTIDA. O CEP AGUARDARÁ A CARTA QUE DEVERÁ SER ANEXADA NA PB POR NOTIFICAÇÃO. PENDÊNCIA ATENDIDA COM RECOMENDAÇÃO.

5- Em relação ao TCLE:

a) retirar do cabeçalho a indicação "anexo": o TCLE é um documento formal: não é um anexo.

PENDÊNCIA ATENDIDA

b) no item 5, está escrito: "Embora todas as medidas razoáveis e apropriadas serão tomadas para manter a confidencialidade das informações de saúde, há sempre a possibilidade de que essas informações possam ser divulgadas inadvertidamente.": será necessário readequar esta frase, pois é obrigação do pesquisador

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

Continuação do Parecer: 933.133

informado que os dados serão mantidos em sigilo.;

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

c) -favor adequar o TCLE, nos campos em que é informado que o participante receberá uma "cópia" do TCLE: não usar a palavra "cópia" e sim, a palavra "via", já que cada TCLE, do participante e do pesquisador, não é uma cópia: é um documento original.;

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

d) - deve ser inserido os dados (telefone e endereço) do CEP/UNIFESP, com a indicação de que o mesmo pode ser procurado caso haja dúvida quanto à ética do estudo (exemplo: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unifesp (Rua Botucatu, 572 ? 1º andar - cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162) ; E-mail: cepunifesp@unifesp.br.)

ANÁLISE: PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO, SEJA PACIENTE OU CONTROLE, DEVE SER INFORMADO O ENDEREÇO E TEL DO CEP DA UNIFESP E NÃO DO HSL. FAVOR ADEQUAR NOS 2 TCLEs.

PENDÊNCIA ATENDIDA COM RECOMENDAÇÃO DO CEP-UNIFESP

e)- deve ser informado que se o participante tiver qualquer dúvida quanto à pesquisa, ele pode procurar o pesquisador responsável (cujo dados para contato está no início do TCLE);

ANÁLISE: NOME E CONTATO DA PESQUISADORA CONSTAM DO TCLE PENDÊNCIA ATENDIDA.

f) - todas as folhas devem ser numeradas (ex: 1/4, 2/4, etc.) e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante da pesquisa no momento da aplicação do TCLE. 6-O TCLE enviado está voltado para os pacientes. Deverá ser enviado um TCLE para os participantes saudáveis.

ANÁLISE: FOI ENVIADO TCLE PARA GRUPO CONTROLE. PENDÊNCIA ATENDIDA

g) Deve deixar claro no TCLE, quantas vezes serão coletadas amostras de sangue para o estudo, qual a quantidade de sangue coletada, e o que será realizado com as amostras coletas para o estudo, além das de rotina. Estas explicações devem estar redigidas em linguagem acessível a leigos, explicando os termos técnicos.

ANÁLISE: ESTAO DESCRITOS OS PROCEDIMENTOS DO ESTUDO, TANTO PARA O GRUPO DE PACIENTES QUANTO PARA O GRUPO CONTROLE. PENDÊNCIA ATENDIDA.

- NOS TCLEs INFORMA:"Para retirar-se desse Estudo, informe o seu médico. Retirando-se do Estudo significa que nenhuma informação adicional sobre você será inserida no Estudo.As informações que já tenham sido coletados serão mantidas no Estudo e poderão continuar a serem utilizadas para as análises, relatórios e outros fins do Estudo."

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 933.133

O PACIENTE PODE RETIRAR-SE DO ESTUDO A QUALQUER MOMENTO E SOLICITAR A RETIRADA DE TODOS DADOS REFERENTES À SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO, MESMO OS QUE JÁ TENHAM SIDO COLETADOS.

ANALISE: TCLEs apresentados adequadamente, de acordo com a resol CNS 466/12

PENDÊNCIA ATENDIDA COM RECOMENDAÇÃO - ADEQUAR O ENDEREÇO DO CEP NOS TCLEs.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br



INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS DE ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 16 de Janeiro de 2015

Declaração de Aceite e Comprometimento como Instituição Co-participante

Protocolo: "**AValiação de Polimorfismos do Gene PIG-A e Avaliação do Perfil Metabólico em Portadores de Hemoglobínúria Paroxística Noturna (HPN)**"

Instituição Proponente: **UNIFESP**

Pesquisador Principal: **Dr. Celso Arrais Rodrigues**


Aluna de Doutorado: **Patricia Eiko Yamakawa**

Declaro para os devidos fins, que o Instituto Sírio Libanês de Ensino e Pesquisa CNPJ: 61.590.410.0001-24, manifesta o total interesse em participar do Projeto de pesquisa supracitado.

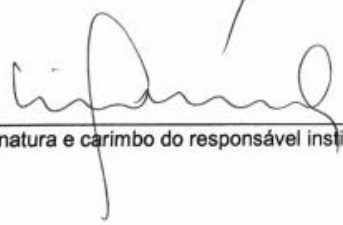
Eu, **Dr. Celso Arrais Rodrigues**, Registro Profissional **CRM 98682** Pesquisador(a) Responsável Institucional pelo Projeto de Pesquisa supracitado, declaro ter lido e concordo com o delineamento do estudo. Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/2012.

Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da confidencialidade dos participantes de pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para realização do projeto.

Atenciosamente,


Assinatura e carimbo do pesquisador responsável institucional

Dr. Luiz Fernando Lima Reis
Superintendente de Pesquisa
ISLEP - Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa


Assinatura e carimbo do responsável institucional

Rua Professor Daher Cutait, 69 - 01308-060 - São Paulo - SP - Tel. 55 11 3155.8800

www.hospitalsiriolibanes.org.br/iep

8.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: “Avaliação de polimorfismos do gene PIG-A e avaliação do perfil metabólico em portadores de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN)”

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, o pesquisador responsável pelo estudo e a equipe desta pesquisa estarão disponíveis para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

Esse é um estudo que será realizado para avaliar as informações sobre o estado de saúde e as informações sobre exames de sangue em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (doença rara que tem como manifestação principal anemia).

O objetivo principal é entender as manifestações clínicas dos pacientes, já que há poucos estudos no Brasil. Assim, com os dados de questionário, de prontuário médico e de exames laboratoriais é possível entender melhor os portadores de hemoglobinúria paroxística noturna brasileiros, suas principais manifestações da doença e o tratamento que está sendo feito no Brasil.

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 24 meses. A sua participação no estudo será de aproximadamente 24 meses, onde serão coletados dados de seu quadro clínico durante as consultas médicas, pelos exames laboratoriais e pela revisão de seu prontuário médico.

Descrição do Estudo

Estudo realizado pelo Hospital Sírio Libanês- São Paulo, através de coleta de exames de sangue para análise e dados de prontuário.

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque tem idade superior a 18 anos e tem o diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna estabelecido por citometria de fluxo de eritrócitos, granulócitos e monócitos.

O (a) Senhor (a) não fará parte do estudo se perder o seguimento clínico, ou recusar-se por algum motivo a participar deste estudo.

Procedimento do Estudo

A sua participação nesse estudo não irá alterar ou afetar os cuidados que você está recebendo do seu médico. Os exames serão realizados através de coleta de sangue na veia do braço, no mínimo em dois momentos. Caso você esteja em tratamento com um medicamento chamado eculizumabe, será coletado sangue antes da infusão do medicamento e vinte e quatro horas após. Em cada coleta serão retirados cerca de 30 mL de sangue. Esse sangue será enviado para análise de exames especiais (quantificação de micropartículas derivadas de hemácias, plaquetas e endotélio; quantificação de CD 35 e CD 47 e análise do gene PIG-A). Parte do material (2mL de plasma) será enviado para realização dos testes de metabolômica em laboratório no exterior (Áustria), sem custo algum para o participante, mantendo total sigilo e anonimato dos participantes. Essas coletas serão realizadas no mesmo momento que os demais exames solicitados de rotina para o acompanhamento de sua doença seriam realizados. Como participante desse Estudo, você também será solicitado a responder uma série de questões sobre sua saúde no início de sua participação durante a visita médica.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo/Descontinuação do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Importante esclarecer, que o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, caso os procedimentos do estudo possam apresentar algum risco para a sua saúde, ou em casos de complicações devido aos procedimentos. Mas isso tudo será devidamente informado ao Sr (a). Além disso, tanto o pesquisador, como as autoridades regulatórias (Comitê de ética em pesquisa, ANVISA), poderá interromper o estudo, caso julgue que o mesmo possa apresentar algum dano aos participantes.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Dr Celso Arrais e Dra Patrícia Eiko Yamakawa que poderão ser encontrados no Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês ou nos respectivos telefones: 11975553009.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste hospital, através do telefone (11) 3394-5701 ou pelo e-mail: cepesq@hsl.org.br.

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado "____". **“Avaliação de polimorfismos do gene PIG-A e avaliação do perfil metabólico em portadores de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN)”**

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Nome do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou
à Máquina

Data

_____	_____
Assinatura do Participante da Pesquisa	
_____	_____
Nome do Representante Legal do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	Data

Assinatura do Representante Legal do Participante da Pesquisa (quando aplicável)	
_____	_____
Nome da pessoa obtendo o Consentimento	Data

Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
_____	_____
Nome do Pesquisador Principal	Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	
_____	_____

Importante: Este documento é elaborado e deverá ser assinado em duas vias: uma será entregue ao participante (sujeito da pesquisa) e a outra via ficará com o pesquisador. Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, em atendimento à CARTA CIRCULAR N° 003/2011 CONEP/CNS/MS disponível no site da CONEP: http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html.

8.5. Ficha de coleta de dados clínicos

Nome: _____	
Número de Identificação: _____	
Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	
Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Cor da pele _____	
Centro: _____	Data inclusão no registro: ____ / ____ / ____

DIAGNÓSTICO	Data: ____ / ____ / ____
Características no Diagnóstico:	
Aplasia <input type="checkbox"/> Hemólise <input type="checkbox"/> Trombose <input type="checkbox"/> Mielodisplasia <input type="checkbox"/>	
Outro: _____	
DHL (UI): _____ Hb (g/dL): _____ Plaquetas ($10^9/L$): _____ PMN ($10^9/L$): _____	
Bilirrubina indireta (mg/dL): _____ Reticulócitos (%) ----- Reticulócitos ($10^9/L$): _____	
COOMBS Direto: positivo <input type="checkbox"/> negativo <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> C3d <input type="checkbox"/>	
Biópsia de medula óssea: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	
Se realizado citar diagnóstico: _____	
Sintomas:	
Data do início dos sintomas: ____ / ____ / ____	
Dor abdominal <input type="checkbox"/> Hematúria <input type="checkbox"/> Disfagia <input type="checkbox"/> Fadiga <input type="checkbox"/> Cefaleia <input type="checkbox"/>	
Outro : _____	
Método diagnóstico: Citometria <input type="checkbox"/> HAM <input type="checkbox"/>	
Data do diagnóstico: ____ / ____ / ____	
Eritrócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): _____	
Neutrófilos % células GPI deficientes (Tipos II+III): _____	
Monócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): _____	

Antecedentes:

Tabagismo ☐ Diabetes ☐ Dislipidemia ☐ HAS ☐

Trombose venosa ☐ (especificar): _____

Trombose arterial ☐ (especificar): _____

Antecedente familiar de trombose ☐ (especificar): _____

TROMBOSE: Data: ____ / ____ / ____

Fase da doença Aplasia ☐ Hemólise ☐ Mielodisplasia ☐

Outro: _____

DHL (UI): _____ Hb (g/dL): _____ Plaquetas ($10^9/L$): _____ PMN ($10^9/L$): _____

Trombose durante o uso de anticoagulante: SIM ☐ NÃO ☐

Se sim, especificar: HNF ☐ HBPM ☐ AVK ☐ Outro: _____

Anticoagulação estava eficaz? SIM ☐ NÃO ☐

RNI ou anti-Xa (mais recente): _____ Data: ____ / ____ / ____

Localização: Budd-Chiari ☐ Porta ☐ Mesentéricas ☐ MMII ☐ EP ☐
Cerebral ☐

Outro (especificar): _____

Método de confirmação: Doppler ☐ RM ☐ TC ☐ Angiografia ☐

Outro (especificar): _____

Fator(es) Desecadeante(s): Espontâneo ☐ Hormonal ☐ Cirúrgico ☐

Outro: _____

Tratamento:

HNF ☐ HBPM ☐ AVK ☐ Outro (especificar): _____

TROMBOSE 2: Data: ____ / ____ / ____

Fase da doença Aplasia ☐ Hemólise ☐ Mielodisplasia ☐

Outro: _____

DHL (UI): _____ Hb (g/dL): _____ Plaquetas ($10^9/L$): _____ PMN ($10^9/L$): _____

Trombose durante o uso de anticoagulante: SIM ☐ NÃO ☐

Se sim, especificar: HNF ☐ HBPM ☐ AVK ☐ Outro: _____

Anticoagulação estava eficaz? SIM ☐ NÃO ☐

RNI ou anti-Xa (mais recente): _____ Data: ____ / ____ / ____

Localização: Budd-Chiari ☐ Porta ☐ Mesentéricas ☐ MMII ☐ EP ☐
Cerebral ☐

Outro (especificar): _____

Método de confirmação: Doppler ☐ RM ☐ TC ☐ Angiografia ☐

Outro (especificar): _____

Fator(es) Desecadeante(s): Espontâneo ☐ Hormonal ☐ Cirúrgico ☐

Outro: _____

Tratamento:

HNF ☐ HBPM ☐ AVK ☐ Outro (especificar): _____

Tratamento da HPN:

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

_____ Data do início: ____ / ____ / ____ Data do término: ____ / ____ / ____

Complicações durante o seguimento:

Hipertensão pulmonar ☐ Data: ____ / ____ / ____

Insuficiência Renal ☐ Data: ____ / ____ / ____

Insuficiência Hepática ☐

Data: ____ / ____ / ____

Infecção por germe encapsulado ☐

Data: ____ / ____ / ____

Especificar o agente identificado: _____

Outra: _____

Especificar método que confirmou a complicação: _____

Transfusões de hemácias:

Antes do diagnóstico: 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ou mais ☐

Após o diagnóstico e até antes do início de eculizumabe: 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ou mais ☐

Após o início de eculizumabe: 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ou mais ☐

Tratamento com Eculizumabe

Data início: ____ / ____ / ____

Fase da Doença Aplasia ☐ Hemólise ☐ Mielodisplasia ☐

Exames pré eculizumabe - Data: ____ / ____ / ____

DHL (UI): ____ Hb (g/dL): ____ Plaquetas ($10^9/L$): ____ PNN ($10^9/L$): ____

Bilirrubina indireta (mg/dL): ____ Reticulócitos ($10^9/L$): ____

COOMBS Direto: positivo ☐ negativo ☐ IgG ☐ C3d ☐

Eritrócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Neutrófilos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Monócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Exames pós eculizumabe (pelo menos 1 mês após) - Data: ____ / ____ / ____

DHL (UI): ____ Hb (g/dL): ____ Plaquetas ($10^9/L$): ____ PNN ($10^9/L$): ____

Bilirrubina indireta (mg/dL): ____ Reticulócitos ($10^9/L$): ____

COOMBS Direto: positivo ☐ negativo ☐ IgG ☐ C3d ☐

Eritrócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Neutrófilos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Monócitos % células GPI deficientes (Tipos II+III): ____

Uso de penicilina oral? Sim ☐ Não ☐

Último acompanhamento: **Data:** ____ / ____ / ____

Fase da Doença Aplasia ☐ Hemólise ☐ Mielodisplasia ☐ Remissão ☐

Outro: _____

DHL (UI): _____ Hb (g/dL): _____ Plaquetas ($10^9/L$): _____ PNN ($10^9/L$): _____

% células GPI negativas: _____ Data: ____ / ____ / ____

Se falecido: Data do óbito ____ / ____ / ____

Causa do óbito:

Especificar:
